



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Física *Gleb Wataghin*

MURILO HENRIQUE MARTINEZ MOREIRA

Quantificação composicional de nanopartículas de AgAu utilizando mapeamento elemental por STEM-EDS.

Campinas

2019

MURILO HENRIQUE MARTINEZ MOREIRA

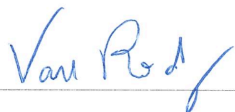
Quantificação composicional de nanopartículas de AgAu utilizando mapeamento elemental por STEM-EDS.

Dissertação apresentada ao Instituto de Física *Gleb Wataghin* como requisito para obtenção do título de Mestre em física na área de física aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Varlei Rodrigues

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado defendida pelo aluno Murilo Henrique Martinez Moreira, e orientada pelo Prof. Dr. Varlei Rodrigues.

Assinatura do Orientador



Campinas

2019

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 134587/2016-2

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Física Gleb Wataghin
Lucimeire de Oliveira Silva da Rocha - CRB 8/9174

M813q Moreira, Murilo Henrique Martinez, 1993-
Quantificação composicional de nanopartículas de AgAu utilizando mapeamento elemental por STEM-EDS / Murilo Henrique Martinez Moreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Varlei Rodrigues.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física Gleb Wataghin.

1. Análise de componentes principais. 2. Espectroscopia de raio X. 3. Microscopia eletrônica de transmissão. 4. Microscopia eletrônica de transmissão de varredura. 5. Nanopartículas. I. Rodrigues, Varlei, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Física Gleb Wataghin. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Compositional quantification of AgAu nanoparticles using elemental mapping by STEM-EDS

Palavras-chave em inglês:

Principal components analysis

X-ray spectroscopy

Transmission electron microscopy

Scanning transmission electron microscopy

Nanoparticles

Área de concentração: Física Aplicada

Titulação: Mestre em Física

Banca examinadora:

Varlei Rodrigues [Orientador]

Alexandre Reily Rocha

Diego Muraca

Data de defesa: 08-02-2019

Programa de Pós-Graduação: Física

MEMBROS DA COMISSÃO JULGADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MURILO HENRIQUE MARTINEZ MOREIRA – RA 122806** APRESENTADA E APROVADA AO INSTITUTO DE FÍSICA “GLEB WATAGHIN”, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, EM 08 / 02 / 2019.

COMISSÃO JULGADORA:

- Prof. Dr. Varlei Rodrigues – Orientador – DFA/IFGW/UNICAMP
- Prof. Dr. Alexandre Reily Rocha – CCNH/UFABC
- Prof. Dr. Diego Muraca – DFA/IFGW/UNICAMP

OBS.: Informo que as assinaturas dos respectivos professores membros da banca constam na ata de defesa já juntada no processo vida acadêmica do aluno.

Aos meus pais, Ana e João por sempre me apoiarem, incentivarem e entenderem.
Aos meus irmãos Paula e Gustavo por me apoiarem e sempre sentirem orgulho de mim.
À minha namorada, Angélica, minha amada companheira.

Agradecimentos

Aos meus pais, meus irmãos e minha namorada, que sempre me incentivaram no meu trabalho, permitindo que eu pudesse dar o melhor de mim.

A todos os meus familiares e amigos queridos, que compartilham das minhas conquistas.

Aos Prof. Dr. Varlei Rodrigues, Dr. Matthias Hillenkamp e Prof. Dr. Daniel Ugarte, por seus ensinamentos e por sempre estarem presentes e dispostos a me ajudar a aprender e crescer profissionalmente.

Ao Dr. Jefferson Bettini, pelas discussões e aprendizados sobre os mais diversos assuntos envolvendo meu trabalho.

Aos colegas de grupo Msc. Rafael Hensel e Maria Helena Gonçalves por darem suporte no preparo de experimentos.

Ao Msc Ângelo Luiz Gobbi pelo preparo de amostras de filme fino de AgAu para calibração.

Aos amigos do GFNMN, pelos momentos de troca de conhecimento e descontração.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que de alguma maneira estiveram presentes e contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
(CAPES) - Código de Financiamento 001

*Só sei que nada sei, e o fato de saber isso, me coloca em vantagem sobre aqueles que
acham que sabem alguma coisa.
(Sócrates)*

Resumo

Palavras-chave: PCA; EDS; TEM; STEM; Nanopartícula.

Nanopartículas multimetálicas são sistemas nanométricos formados por dois ou mais metais, que podem formar diversos tipos de estruturas e adotar diferentes morfologias. Ao se controlar o tamanho e a composição química destes sistemas, diferentes propriedades físicas e químicas podem ser obtidas devido à fenômenos quânticos e de superfície. Assim, é de interesse estabelecer um método de síntese com controle de tamanho e composição química de nanopartículas bimetálicas e sua caracterização estrutural e composicional. O método de síntese escolhido para fabricar as nanopartículas foi uma fonte de nanopartículas por agregação em gás, utilizando um *magnetron sputtering* cilíndrico como fonte de átomos para a agregação. Nesse sistema de síntese, o controle de tamanho pode ser feito *in situ* com um espectrômetro de massa por tempo de voo, e o controle da composição química, através da escolha adequada de um alvo com fios metálicos trançados, de onde serão retirados os átomos para gerar as nanopartículas. Para quantificar a sua composição química foram utilizadas medidas de microscopia eletrônica de transmissão e varredura (STEM) e espectroscopia por dispersão em energia (EDS), que possibilitam a caracterização de partículas individuais com resolução espacial. Para a análise química quantitativa das nanopartículas bimetálicas foi proposto e desenvolvido uma metodologia de quantificação composicional de nanopartículas individuais, utilizando técnicas de processamento de imagens e de redução de ruído de imagens espectrais de EDS, associadas ao método de Cliff-Lorimer. A metodologia, foi implementada em python de tal forma que a análise seja semi-automática e com intervenção mínima do usuário, reduzindo o viés humano na análise dos dados. Para quantificar a composição química das nanopartículas com o maior grau de precisão possível, dado a condição limite da técnica para estes diminutos nanossistemas (2.5 nm - 9 nm), foi utilizada a ferramenta de *machine learning*, análise de componentes principais (PCA). Que funciona como filtro de ruído em imagens espectrais geradas por STEM-EDS. Também com o uso de PCA, foi possível aumentar a probabilidade de sucesso ao realizar a identificação automática nos conjuntos de dados, uma vez que as partículas nas micrografias e os espectros nos dados de STEM-EDS se tornam melhor definidos. Três amostras de nanopartículas de AgAu foram preparadas, com três diferentes composições, e foram medidas por volta de 60 nanopartículas para cada uma delas, obtendo as composições médias em porcentagem de átomos de Au. Os valores obtidos para as três sínteses foram $(76 \pm 3)\%$, $(54 \pm 4)\%$ e $(49 \pm 2)\%$. Embora tenha sido verificada uma sensível redução de ruído no conjuntos de dados utilizando PCA, foi verificado um efeito inesperado na quantificação composicional. As composições medidas de nanopartículas pertencentes ao mesmo conjunto de dados tem seus valores convergindo para um valor médio. Este efeito, que também foi verificado através de simulações realizadas neste trabalho, se deve

à condição limite da técnica de caracterização. Onde a quantidade de sinal para resolver a variação de composição, entre uma nanopartícula e outra, é insuficiente e induz um *bias* na quantificação composicional. Mas ainda assim, o uso de PCA para redução de ruído de dados hiperspectrais de STEM-EDS, é efetivo e possibilita o desenvolvimento de um método semi-automático de caracterização composicional das nanopartículas, com redução da incerteza associada às composições químicas medidas. Para evidenciar a validade do uso de PCA na redução da incerteza na quantificação composicional de imagens espectrais, foi realizada também, a análise de nanofio InGaP. Onde a relação sinal-ruído foi suficiente para verificar a redução do ruído sem a indução de artefatos devido ao *bias* estatístico, permitindo a estimativa de uma incerteza inferior à de Poisson. Assim, foram realizados experimentos buscando aumentar as contagens dos mapas elementais, utilizando outro microscópio eletrônico de transmissão com mais detectores e operando à 80kV de aceleração do feixe de elétrons, o que proporcionou um aumento de um fator 10 nas contagens. Este valor foi suficiente para quantificar a composição química das nanopartículas de AgAu sem a introdução de erros sistemáticos pelo uso de PCA como redutor de ruído, permitindo portanto, diferenciar as composições químicas das nanopartículas.

Abstract

Multimetallic nanoparticles are nanometric systems formed by two or more metals, which can form different types of structures and adopt different morphologies. By controlling the size and chemical composition of these systems, different physical and chemical properties can be obtained due to quantum and surface phenomena. Thus, it is of interest to establish a method of synthesis with control of size and chemical composition of bimetallic nanoparticles and their structural and compositional characterization. The method chosen to make the nanoparticles is a source of nanoparticles by gas aggregation using a cylindrical magnetron sputtering as source of atoms. In this type of synthesis, the size control can be done in situ with a time-of-flight mass spectrometer, and the control of the chemical composition by appropriate choice of a target with twisted metallic wires, from where the atoms will be withdrawn to generate the nanoparticles. To quantify its chemical composition, Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM) measurements with Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) were used to characterize individual particles with spatial resolution. For the quantitative chemical analysis of bimetallic nanoparticles, a methodology was proposed and developed for compositional quantification of individual nanoparticles, using image processing and noise reduction techniques of EDS spectral images, associated to the Cliff-Lorimer method. The methodology was implemented in python in such a way that the analysis is semi-automatic and with minimal user intervention, reducing human bias in data analysis. In order to quantify the chemical composition of the nanoparticles with the highest degree of precision possible, given the limiting condition of the technique for these tiny nanosystems (2.5 nm - 9 nm), a tool from machine learning named Principal Component Analysis (PCA) was used. That works as a noise filter in spectral images generated by STEM-EDS. Also with the use of PCA, it was possible to increase the probability of success in performing the automatic identification in the datasets, since the particles in the micrographs and the spectra in the STEM-EDS data become better defined. Three samples of AgAu nanoparticles were prepared with three different compositions and were measured at about 60 nanoparticles for each of them, obtaining the average compositions as a percentage of Au atoms. The values obtained for the three syntheses were $(76 \pm 3)\%$, $(54 \pm 4)\%$ and $(49 \pm 2)\%$. Although a significant noise reduction was verified in the datasets using PCA, an unexpected effect on compositional quantification was observed. The measured nanoparticle compositions belonging to the same data set have their values converging to an average value. This effect, which was also verified through simulations performed in this work, is due to the limiting condition of the characterization technique. Where the amount of signal to resolve composition variation between one nanoparticle and another is insufficient and induces a statistical bias in compositional quantification. However, the use of PCA for noise reduction of STEM-EDS hyperspectral data is effective and allows the development of a semi-automatic method of

compositional characterization of the nanoparticles, with reduction of uncertainty from the chemical compositions measured. To demonstrate the validity of the use of PCA in the reduction of uncertainty for compositional quantification of spectral images, an analysis with InGaP nanowire was also performed. Where the signal-to-noise ratio was sufficient to verify noise reduction without induction of artifacts due to statistical bias, allowing the estimation of a lower uncertainty than Poisson's. Thus, experiments were carried out to increase the the counts from the elemental mapping using another transmission electron microscope with more detectors and operating at 80 kV electron beam acceleration, which provided an increase of a factor 10 in number of counts. This value was sufficient to quantify the chemical composition of AgAu nanoparticles without systematic errors by the use of PCA as denoising, allowing therefore, to differentiate the chemical compositions of the nanoparticles.

Keywords: PCA; EDS; TEM; STEM; Nanoparticles.

Lista de ilustrações

Figura 1 – Representação esquemática de um agregado atômico com a maior parte de seus átomos na superfície e valores estimados, do número de átomos superficiais e volumétricos, para tamanhos variados.	26
Figura 2 – Temperatura de fusão de nanopartículas de Au em função do diâmetro. Pontos representam dados experimentais, linha continua o ajuste de uma curva sobre os dados e a linha tracejada a temperatura de fusão aproximada em <i>bulk</i> . Adaptado de (BUFFAT; BOREL, 1976).	26
Figura 3 – Representação esquemática da ressonância de plasmons de superfície em nanopartículas metálicas. Adaptado de (PEIRIS; MCMURTRIE; ZHU, 2016).	27
Figura 4 – Bandas de absorção de plasmons de superfície de nanopartículas de Ag, Au e Cu. Adaptado de (SCAIANO; STAMPLECOSKIE; HALLETT-TAPLEY, 2012).	28
Figura 5 – Atividade catalítica de NP's na reação de hidrogenação de ciclohexano à 25.0 °C, em função da porcentagem atômica de Rh para NP's de RhAg (cinza) e de RhAu (amarelo) em comparação com Rh pura (linha tracejada azul). Adaptado de (GARCÍA et al.,).	29
Figura 6 – Esquemático de diferentes morfologias de nanopartículas bimetálicas. Adaptado de (FERRANDO; JELLINEK; JOHNSTON, 2008)	29
Figura 7 – (A) Imagem STEM-HAADF de uma NP de AgAuCuCoNi típica 19% Au, 24% Ag, 28% Cu, 14% Co, 15% Ni). (B) Ilustração esquemática da estrutura da NP de AgAuCuCoNi de (A). A NP segrega-se em três fases de ligas AgAu, AuCu e CoNi. (C a G) Mapeamentos elementais STEM-EDS da NP de (A). (C) Distribuição de cada metal na NP. (D) Sobreposição dos elementos Au, Ag, e Cu. (E) Sobreposição dos elementos Ag, Cu, e Co. (F) Sobreposição dos elementos Co e Ni (G) Sobreposição de todos os cinco elementos. Extraído de (CHEN et al., 2016).	30
Figura 8 – (A a D) Ilustração esquemática, imagens STEM-HAADF, e mapa elemental STEM-EDS de quatro NP's representativas de AuAgCu NPs com diferentes quantidades de Au. De (A) até (D), a porcentagem de Ag e de Cu são iguais em cada NP e a porcentagem de Au aumenta gradativamente de 10% até 70%. A linha tracejada em (A) e (B) indica a posição da interface das fases. Barras de escala de 20 nm. Adaptado de (CHEN et al., 2016).	31

Figura 9 – Representação esquemática de (a) um cubo de dados de coordenadas (x,y,E) e (b) Sequência de planos transversais do cubo de dados, representando imagens cujas intensidades por pixel, são definidas por contagens de canais em energia. Extraído e adaptado de < http://zeiss.magnet.fsu.edu/tutorials/spectralimaging/lambdastack/indexflash.html >, em 21/11/2018.	32
Figura 10 – Resultados de identificação de fases por PCA e ICA em imagem espectral de nanopartículas <i>core-shell</i> $Co@Fe_3O_4$. (a) Proporção de variâncias de 50 componentes determinadas por PCA, (b) componentes independentes calculadas à partir das componentes principais do PCA, contendo as linhas de Raio X para os elementos presentes. Mapas das componentes independentes (c-e) revelando que (c) IC#0 correspondente aos núcleos, (d) IC#1 às cascas, e (e) IC#2 ao fundo de carbono da grade de microscopia. Escala 50 nm e barra de cor normalizada. Adaptado de (ROSSOUW et al., 2015).	33
Figura 11 – Comparação da quantificação da composição de nanopartículas FePt anterior à adição da casca Fe_3O_4 , com a quantificação pela componente IC#0 após a adição da casca. Adaptado de (ROSSOUW et al., 2015) .	35
Figura 12 – Espectro de foto-emissão normalizado obtido por excitação de plasmões de superfície, via injeção de elétrons pela ponta de um STM (<i>Scanning Tunneling Microscope</i>). Amostras de norigas de AgAu depositadas em filme fino de Al_2O_3 com diferentes porcentagens de átomos de Ag. Adaptado de (BENTEN et al., 2005)	36
Figura 13 – (a) Imagem STEM-HAADF de uma nanopartícula de AgAu de composição química 1:1 e tamanho aproximado de 9 nm. (b,c e d) Mapas elementais EDS de Au, Ag, e sobreposição respectivamente. Regiões amarela no mapa indicam presença de ouro e região cinza indica presença de prata. A sobreposição evidencia o enriquecimento de prata na superfície. Extraído de (GUISBIERS et al., 2016).	37
Figura 14 – Representação esquemática de uma fonte de agregados utilizada para síntese de nanopartículas por agregação em gás (HUTTEL, 2017). . . .	38
Figura 15 – Esquemático do crescimento de nanopartículas por agregação em gás, adaptado de (HUTTEL, 2017).	39
Figura 16 – Variação da energia livre de Gibbs para a formação de agregados atômicos de raio R para diferentes superssaturações ϕ_k . Extraído e adaptado de (TAVARES, 2013).	41
Figura 17 – Representação esquemática da fonte de agregados atômicos utilizada para a síntese das nanopartículas metálicas com detalhes de componentes do instrumento (TAVARES, 2013).	42

Figura 18 – Espectro de diâmetros de nanopartículas de Ag para três diferentes distribuições de tamanhos centradas em 0.8, 2.2 e 3.8 nm. (TAVARES, 2013).	43
Figura 19 – Representação esquemática do <i>magnetron sputtering</i> cilíndrico (TAVARES, 2013) e em <i>inset</i> uma imagem de um alvo de fios metálicos de ouro e prata trançados.	44
Figura 20 – Diagrama esquemático de um microscópio eletrônico de transmissão (TIZEI, 2008).	45
Figura 21 – Esquemático da geração de imagens de um TEM convencional, com a representação do plano objeto (amostra), plano focal (padrão de difração) e plano imagem. Extraído e adaptado de < http://www.microscopy.ethz.ch/TEM_imaging.htm >, em 14/10/2018.	46
Figura 22 – Esquemático da geração de imagem Dark Field em um TEM convencional, com a representação da abertura objetiva selecionando o feixe difratado no plano focal. Extraído e adaptado de < http://www.microscopy.ethz.ch/TEM_DF.htm >, em 14/10/2018.	47
Figura 23 – Esquemático da geração de imagem Bright Field em um TEM convencional, com a representação da abertura objetiva selecionando o feixe direto no plano focal. Extraído e adaptado de < http://www.microscopy.ethz.ch/TEM_BF.htm >, em 14/10/2018.	48
Figura 24 – Esquemático da geração de imagem HRTEM, com a representação da abertura objetiva selecionando o feixe direto e os feixes difratados no plano focal. Extraído e adaptado de < http://www.microscopy.ethz.ch/TEM-HRTEM.htm >, em 14/10/2018.	48
Figura 25 – Representação esquemática da aquisição de dados no modo STEM. . .	49
Figura 26 – Imagens de microscopia de transmissão no modo de varredura de nanopartículas de ouro geradas no equipamento JEM 2100F do LNNano a) Imagem de campo claro e b) Imagem de campo escuro.	50
Figura 27 – Representação esquemática da interação da sonda de elétrons incidente com a amostra, gerando os sinais necessários para a aquisição de mapas elementais.	51
Figura 28 – Ilustração do fenômeno físico de emissão de fótons por excitações eletrônicas externas. Imagem extraída do site < http://www.wikiwand.com/en/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy >, em 22/06/2018	52
Figura 29 – Representação esquemática da disposição do detetor de fótons de Raios X característico inserido na coluna do microscópio, próximo ao porta amostras localizado entre as peças polar da lente objetiva.	52
Figura 30 – Espectro EDS típico de nanopartículas de AgAu.	53

Figura 31 – Perfis de emissão devido a desexcitação de átomos ionizados em função do número atômico. Elétrons Auger em vermelho e Raios X característico em azul. Imagem extraída do site < https://en.wikipedia.org/wiki/File:Auger_Yield.svg >, em 08/10/2018.	54
Figura 32 – Comparação do tamanho relativo do feixe e do volume de interação em A) Um microscópio eletrônico de varredura (<i>Scanning Electron Microscope - SEM</i>), um microscópio analítico (AEM) com B) fonte de elétrons termiônica e C) fonte por efeito de campo (<i>Field Emission Gun - FEG</i>) com amostras (<i>bulk</i>), fina e ultrafina respectivamente. A MMF (0.01%) corresponde à 10^{-7} átomos, 300 átomos e 1 átomos respectivamente (WILLIAMS et al., 2009).	55
Figura 33 – Ilustração em distribuições normais dos limites de decisão, detecção e quantificação de sinais	56
Figura 34 – Ilustração de um cubo de dados de STEM-EDS onde as coordenadas espaciais são dadas por (x,y) e a coordenada espectral é dada por energia (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003).	57
Figura 35 – STEM-HAADF, HRTEM e mapeamento elemental de nanopartículas metálicas com diferentes composições químicas. A) Identificação de fase por STEM-HAADF e análise elemental por STEM-EDS de NP de AuAgNi; B) Modelo para visualização da morfologia da NP de AuAgNi; C) HRTEM da NP de AgAuNi com medida aproximada dos planos cristalinos; D) Mapa de fase da NP de AuAgNi; E) STEM-HAADF e STEM-EDS de NP's de AgAuNi variando a porcentagem de níquel; F) Mapas elementais STEM-EDS de NP de CoCuAg; G) Modelo para visualização da morfologia da NP de CoCuAg; H) STEM-HAADF CoCuAg e I) STEM-HAADF e STEM-EDS de NP's de CoCuAg variando a composição química (CHEN et al., 2016).	58
Figura 36 – Representação esquemática do filme fino de AgAu depositado para calibração do método de quantificação composicional.	61
Figura 37 – Gráfico semilog da evolução razão das composições de Ag e Au em função da contagem de Au acumulada no tempo (BRAIDY et al., 2008).	63
Figura 38 – Relação entre o cubo de dados e as componentes principais para um caso hipotético onde n é número de componentes determinado pela análise, x e y as coordenadas espaciais e p o número de canais de energia por espectro (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003).	66
Figura 39 – Comparação de espectros de um único pixel, em azul espectro original e em preto o espectro após aplicação de PCA. (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003)	68

Figura 40 – Gráfico da proporção das variâncias das componentes geradas pelo PCA aplicado nos dados de STEM-EDS do filme fino de AgAu, as variâncias em vermelho representam as variâncias a serem utilizadas na reconstrução do conjunto de dados e as azuis o resíduo a ser descartado como ruído poissoniano.	69
Figura 41 – Gráficos da proporção de variância das componentes principais. À esquerda sem estabilização da variância e à direita com a estabilização.	70
Figura 42 – Fluxograma do procedimento a ser utilizado na aplicação de análise de componentes principais em dados de STEM-EDS para a quantificação de nanopartículas bimetálicas.	70
Figura 43 – Dados reconstruídos com as três primeiras componentes principais (de cima para baixo) de dados hiperspectrais simulados. Em preto com menos pixels e sem ruído, em azul com menos pixels e com ruído e em amarelo com mais pixels e com ruído (SPIEGELBERG; RUSZ, 2017).	72
Figura 44 – Espectros simulados para a construção da imagem espectral, em azul espectro para associar a pixels que formam as partículas e em vermelho espectro que forma o fundo.	73
Figura 45 – Cubo de dados simulado para nanopartículas de mesmos tamanho e composição química. Na esquerda, imagem espectral livre de ruído e na direita com ruído.	74
Figura 46 – Proporção de variância da decomposição em componentes utilizando PCA no conjunto de dados simulado. Na esquerda conjunto de dados livre de ruído e na direita conjunto de dados aplicado ruído poissoniano.	74
Figura 47 – Cubo de dados simulado com duas populações composicionais diferentes. Na esquerda, imagem espectral livre de ruído e na direita com ruído. .	75
Figura 48 – Proporção de variância da decomposição em componentes utilizando PCA no conjunto de dados simulado com duas populações de nanopartículas. Na esquerda conjunto de dados livre de ruído e na direita conjunto de dados aplicado ruído poissoniano.	76
Figura 49 – Composição química em porcentagem de átomos de Au. Na esquerda conjunto de dados com menos contagens e na direita com mais contagens. Em verde simulação sem ruído e sem filtro por PCA (Bruto), em amarelo sem ruído mas com filtro por PCA, em azul bruto e com ruído e em vermelho com ruído e com filtro por PCA.	76
Figura 50 – STEM-EDS de filme fino de AgAu. A) Mapa elemental gerado com todas as contagens de tudo que foi medido pela amostra e B) Espectro total do mapa elemental com ajuste da curva feito sobre a região de interesse onde estão localizadas as emissões AgL_{α} e AuM_{α}	78

Figura 51 – Gráfico semilog da evolução da razão das composições de Ag e Au em função da contagem de AuM α acumulada no tempo.	79
Figura 52 – Comparação da distribuição de tamanhos da deposição de nanopartículas de AgAu. Curva em preto corresponde ao espectro adquirido pelo TOF e em vermelho corresponde a 928 nanopartículas medidas por STEM-DF.	81
Figura 53 – Mapas elementais gerados por STEM-EDS de nanopartículas de AgAu. Intensidades de A) AgL α , B) AgL α pós PCA, C) AuM α e D) AuM α pós PCA.	82
Figura 54 – Gráfico da proporção das variâncias das componentes geradas pelo PCA aplicado nos cubos de dados de STEM-EDS das nanopartículas de AgAu, as variâncias em vermelho representam as variâncias a serem utilizadas na reconstrução do conjunto de dados e as azuis o resíduo a ser descartado como ruído.	83
Figura 55 – Imagem segmentada das nanopartículas de AgAu e medida do tamanho de uma partícula, em azul.	84
Figura 56 – Comparação do efeito do PCA na identificação das nanopartículas. a) Sem redução de ruído por PCA e b) com redução de ruído por PCA.	85
Figura 57 – Ajuste do espectro de EDS da nanopartícula selecionada na figura 55	85
Figura 58 – Composições químicas de NP's de AgAu obtidas de três sínteses diferentes analisando partículas individuais por STEM-EDS e espectros de TEM-EDS para análise das composições médias. Composição química de A) 61 NP's amostra 1:1, B) 58 NP's amostra 1:2 e C) 51 NP's amostra 1:3 analisadas com PCA em vermelho e sem PCA em azul, linha tracejada composição média obtida por TEM-EDS e linha cheia composição média das nanopartículas individuais analisadas por STEM-EDS e processadas por PCA. D) Espectro de EDS em vermelho e ajuste do espectro de TEM-EDS da amostra em azul 1:1, E) 1:2 e F) 1:3.	87
Figura 59 – Distribuição de composições químicas individuais de nanopartículas de AgAu provenientes da amostra 1:3. Em azul dados brutos sem redução de ruído por PCA e em vermelho dados filtrados utilizando PCA. Uma região de interesse é selecionada para melhor visualização das composições químicas das NP's, separadas por linhas azuis verticais, que delimitam diferentes cubos de dados processados por PCA.	88
Figura 60 – "Mega" cubo de dados gerado acoplando 4 mapeamentos de duas composições químicas diferentes e gráfico das composições individuais das NP's com PCA em vermelho e bruto em azul.	89

Figura 61 – Espectros TEM-EDS ajustados para quantificação de composição química de amostras feitas com fio metálico 1:1 com diferentes tempos de pulverização. A) Amostra depositada após 1h de pulverização e B) amostra depositada após 4h de pulverização.	90
Figura 62 – Gráfico da composição de Au em porcentagem de átomos de 20 nanopartículas de AgAu com e sem a redução de ruído por PCA.	90
Figura 63 – Esquemático do nanofio semiconductor de InGaP crescido pela técnica CBE à partir de uma nanopartícula de Au.	91
Figura 64 – Mapas elementais do nanofio de InGaP feitos com as intensidades de Raios X característico dos elementos pertencentes ao material. Em vermelho região de interesse para calibração da quantificação, onde as contagens de Ga tendem a zero.	92
Figura 65 – Esquemático de como o algoritmo obtém contagens das coordenadas de interesse, ignorando as contagens que não pertencem ao nanofio. . . .	93
Figura 66 – Contagens de Raios X característico obtidas integrando as intensidade de pixels linha por linha do mapa elemental do nanofio de InGaP. À esquerda resultados referente aos dados brutos e à direita aos dados filtrados por PCA.	93
Figura 67 – Gráficos da razão In/P em porcentagem de átomos ao longo do nanofio. À esquerda, conjunto de dados bruto sem filtro por PCA e à direita conjunto de dados filtrado por PCA.	94
Figura 68 – Gráficos das contagens de In e P dos dados brutos e dos dados filtrados por PCA com seus respectivos desvio padrão, média e incerteza de Poisson da contagem média.	95
Figura 69 – Gráficos das composições químicas de uma região de interesse para a análise da redução de ruído. À esquerda quantificação composicional dos dados brutos e à direita dados filtrados por PCA	96
Figura 70 – Ilustração esquemática da geometria da lente objetiva e do sistema de detecção. À esquerda uma lente objetiva com grande espaçamento entre as peças polares, permitindo que um maior ângulo sólido de Raio X emitido possa ser coletado pelo detector. À direita o mesmo sistema, mas com um espaçamento entre as peças polares reduzido, limitando o ângulo sólido de coleção de Raio X característico mesmo com um detector de grande área.	97
Figura 71 – Gráfico das contagens de $\text{AgL}\alpha$ em função do diâmetro das nanopartículas de AgAu.	98
Figura 72 – Esquemático do sistema de detecção utilizado no microscópio Cubed Titan-Themis	98

Figura 73 – Mapa elemental STEM-EDS gerado pelas intensidades de $\text{AgL}\alpha$ e $\text{AuM}\alpha$ e gráfico das composições químicas individuais das nanopartículas de AgAu.	99
Figura 74 – Espectros de um único pixel do cubo de dados de um mapeamento elemental de nanopartícula de AgAu. Em Azul espectro do conjunto de dados bruto e em laranja do conjunto de dados processado por PCA. .	100
Figura 75 – Esquemático da distribuição de átomos de Ag e Au gerada pela erosão de um alvo metálico em um <i>magnetron sputtering</i> cilíndrico	103

Lista de tabelas

Tabela 1 – Parâmetros utilizados na aquisição de dados de mapas elementais por STEM-EDS.	63
Tabela 2 – Valores da composição química média das amostras de nanopartículas de AgAu de três sínteses diferentes em porcentagem de átomos de Au.	88

Sumário

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1	Nanopartículas metálicas	25
2.2	Imagens espectrais em microscopia eletrônica	31
2.3	Nanopartículas bimetálicas de AgAu	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1	Fonte de agregados atômicos e nanopartículas	38
3.2	Microscopia eletrônica de transmissão - TEM	44
3.2.1	Microscopia eletrônica de transmissão e varredura - STEM	49
3.2.2	Espectroscopia por dispersão de energia - EDS	51
3.2.3	Mapeamento elemental e dados hiperspectrais	57
3.2.4	Quantificação da composição química pelo método de Cliff-Lorimer	59
3.2.5	Dano por radiação e controle de dose.	61
3.3	Análise de componentes principais - PCA	64
3.3.1	Uso de PCA na redução de ruído em dados hiperspectrais gerados por espectroscopia STEM-EDS	65
3.3.2	Limitações do uso de PCA em dados hiperspectrais	70
4	RESULTADOS	73
4.1	Efeito do PCA na quantificação da composição química de nanopartículas bimetálicas - Simulação de dados hiperspectrais	73
4.2	Determinação da constante de calibração K_{AgAu} para quantificação composicional.	77
4.3	Danos nas nanopartículas e efeitos na quantificação composicional.	79
4.4	Quantificação semi-automatizada da composição de diferentes sínteses de nanopartículas de AgAu.	80
4.5	Verificação do efeito de pulverização do alvo metálico na composição obtida na síntese das nanopartículas de AgAu	89
4.6	Redução de ruído por PCA na quantificação de nanofios InGaP.	90
4.7	Aumentando contagens - Medidas à 80 kV	96
5	DISCUSSÃO	101
	REFERÊNCIAS	112

1 Introdução

Nanopartículas são sistemas compostos por dezenas até milhões de átomos, com diâmetros que variam desde décimos até dezenas de nm. Suas propriedades são definidas por fenômenos quânticos e de superfície, possuindo diferentes propriedades em função do seu tamanho, como variação na temperatura de fusão (CASTRO et al., 1990) e excitação de plasmons de superfície (AMENDOLA et al., 2017). Nanopartículas podem ser produzidas por via física utilizando métodos de síntese na fase vapor (SWIHART, 2003) ou por via química em suspensão coloidal (HÜHN et al., 2017), com posterior deposição das partículas em matrizes inertes ou adsorvidas em superfícies.

Assim como é feito para as ligas metálicas macroscópicas, ao combinar as propriedades dos elementos na nanoescala, é de interesse a exploração de novas possibilidades para ciências dos materiais, misturando elementos metálicos e formando sistemas multimetálicos diversos. Estes sistemas, podem ter seus elementos segregados com separação de fases, ou misturados com formação de nanoligas metálicas (CHEN et al., 2016).

O principal interesse em estudar nanopartículas multimetálicas é a possibilidade de variar propriedades físicas e químicas em função não somente do tamanho, mas também da morfologia e da composição química, selecionando diferentes números de átomos e ordenamentos atômicos. Devido a estas possibilidades, nanopartículas multimetálicas tem sido largamente estudadas em função de suas propriedades óticas (CORTIE; MCDONAGH, 2011), magnéticas (LU et al., 2008; DUPUIS et al., 2015) e catalíticas (GARCÍA et al., ; BUCHWALTER; ROSÉ; BRAUNSTEIN, 2015), entre outras. Através das nanoestruturas multimetálicas, essas propriedades podem ainda ser acopladas, criando novos materiais com efeitos de magneto-plasmônica (XU; HOU; SUN, 2007; MAKSYMOW,) e catálise plasmônica (ASLAM; CHAVEZ; LINIC, 2017). Assim, é de interesse o desenvolvimento de um método de síntese de nanopartículas de tamanho e composição química controlados, que neste projeto se dará pelo uso de uma fonte de nanopartículas por agregação em gás, utilizando como fonte de átomos para agregação um *magnetron sputtering* cilíndrico (SÁ et al., 2014).

Um possível sistema para estudar propriedades que variam com a composição, é a nanopartícula de AgAu devido a sua relativa simplicidade, pois ambos os elementos possuem número atômico elevado comparado à outros metais e possuem uma baixa oxidação no caso da prata e nenhuma oxidação no caso do ouro. Sendo estes, fatores que facilitam as caracterizações por microscopia eletrônica de transmissão.

Nanopartículas de AgAu tem sido utilizadas para controlar a resposta ótica em função de sua composição química, morfologia e tamanho (GUISBIERS et al., 2016) e

também, como catalisadores em reações de oxidação de CO (WANG; CHANG; MOU, 2005). Dependendo das condições, nanopartículas de AgAu podem ser *Core-Shell* ou nanoligas (LASSERUS et al., 2018), e é de interesse investigar qual destes padrões nanopartículas fabricadas por agregação em gás irão se estabilizar, se haverá ordem química e se existe uma composição química preferencial. Para responder estas questões, é necessário o uso de uma ferramenta que possibilite a análise química com resolução espacial suficiente para caracterizar cada nanopartícula individualmente. Portanto, a técnica de caracterização escolhida é a de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura conhecida por STEM (*Scanning Transmission Electron Microscopy*) que combinada com a técnica de espectroscopia EDS (*Energy Dispersive X Ray Spectroscopy*), permite o estudo analítico com resolução espacial de nanossistemas gerando mapas elementais (LIU et al., 2015; CHEN et al., 2016).

Devido ao grande volume de dados obtidos em microscopia eletrônica analítica, tem sido proposto o uso de ferramentas de *machine learning* como PCA (*Principal Components Analysis*) e ICA (*Independent Components Analysis*), que fazem uso desse volume de dados para qualificar o que é ruído e o que é informação, otimizando a análise quantitativa dos mapas elementais (PARISH; BREWER, 2010; ROSSOUW et al., 2015).

Nesse projeto a composição química das nanopartículas de AgAu produzidas será quantificada, com o intuito de verificar a distribuição das composições, constatando se estarão ao redor de uma composição média com um determinado desvio padrão. Isso permite a síntese de amostras modelo, com nanopartículas de tamanho e composição químicas controlados. Para tanto, é proposta a utilização de uma metodologia semi-automática em python para o processamento dos mapas elementais, utilizando algoritmos de processamento de imagens e filtro de ruído por PCA (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003). Essa metodologia permitirá a análise semi-automatizada das nanopartículas individualmente, minimizando erros humanos e estatísticos na quantificação composicional.

Este manuscrito apresenta no capítulo 2 uma visão geral do que são nanopartículas multimetálicas e exemplos de aplicações em ciência básica, com maior foco no sistema binário AgAu, que será o objeto de estudo da dissertação de mestrado. No capítulo 2 também serão apresentadas as metodologias que estão sendo estabelecidas pela comunidade de microscopia eletrônica para processamento de imagens espectrais utilizando algoritmos de *machine learning*. No capítulo 3 serão apresentadas as metodologias experimentais utilizadas para síntese e caracterização das nanopartículas de AgAu e a metodologia proposta para o processamento dos dados. No capítulo 4 serão apresentados resultados relativos a metodologia de quantificação composicional de nanopartículas de 3 nm a 9 nm e análise do efeito do algoritmo redutor de ruído utilizado nos mapas elementais. Ainda no capítulo 4 também serão apresentados resultados, correspondentes à síntese de amostras modelo de nanopartículas com composição química e tamanho controlados. Por

fim, no capítulo 5 serão discutidos os resultados obtidos e respectivamente, as conclusões e perspectivas do trabalho.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Nanopartículas metálicas

A nanotecnologia, se popularizou por volta dos anos 1970 e 1980. No entanto, nanossistemas tem sido utilizados ao longo dos séculos para a produção de materiais. Os povos da Era do Bronze (1200 - 1000 AC) em Frattesina di Rovigo, na antiga Itália, já produziam vidros coloridos em vermelho. A sua cor se deve à excitação de plasmons de superfície de nanopartículas de cobre localizadas na superfície do material (ANGELINI et al., 2004). Hoje, o entendimento destes sistemas é algo mais bem estabelecido e a investigação de suas propriedades, proporciona a produção de conhecimento em nanociência e de potenciais tecnologias, como aplicações médicas com hipertermia (HEDAYATNASAB; ABNISA; DAUD, 2017) e desenvolvimento de sensores (MERCANTE et al., 2015; Piriya V.S. et al., 2017).

Nanopartículas metálicas são sistemas compostos por átomos metálicos, com diâmetros que variam desde décimos até dezenas de nanômetros. Suas propriedades são definidas por fenômenos quânticos e de superfície, possuindo diferentes propriedades em função do seu tamanho, formato e composição química (GAUDRY et al., 2003). Estes sistemas, podem ser produzidos de diversas maneiras, sendo opções típicas a síntese por via química em suspensão coloidal (HÜHN et al., 2017) e por via física, com métodos de síntese na fase vapor (SWIHART, 2003) utilizando como fonte de átomos, ablação a laser ou pulverização por *magnetron sputtering* de um alvo metálico macroscópico. Diferentes métodos de síntese, apresentam diferentes características no crescimento das nanopartículas. Métodos baseados em síntese química, usualmente, fazem uso de uma etapa de passivação para interromper o crescimento do sistema e estabilizar a sua estrutura. Métodos de via física, por outro lado, embora sejam pouco eficientes quando comparados aos de via química, possuem a vantagem de não necessitar do uso de passivantes.

Em estruturas nanométricas, a fração de átomos superficiais é maior do que para materiais *bulk* e essa fração varia em função do tamanho do objeto, conforme ilustrado pela figura 1, onde a maior parte dos átomos do agregado se encontram na superfície da estrutura. São expostos também, valores estimados do número de átomos superficiais e volumétricos para estruturas de 1 nm até 10^7 nm, para ilustrar como que a fração superficial de átomos aumenta com a redução do tamanho do sistema.

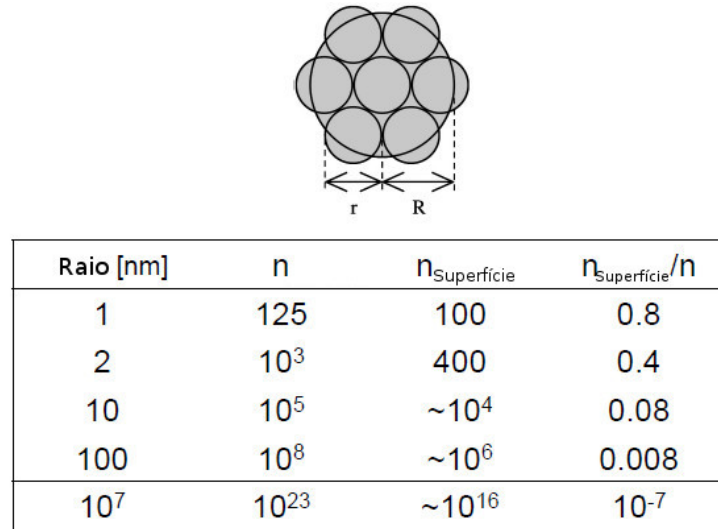


Figura 1 – Representação esquemática de um agregado atômico com a maior parte de seus átomos na superfície e valores estimados, do número de átomos superficiais e volumétricos, para tamanhos variados.

Essa razão entre os átomos superficiais e de volumétricos leva a ocorrência de efeitos geométricos, como a relação entre a temperatura de fusão e o tamanho de nanopartículas, conforme ilustrado pela figura 2. Nesse exemplo, a temperatura de fusão do ouro é consideravelmente reduzida para nanopartículas menores que 5 nm e se aproxima, da temperatura de fusão de ouro em *bulk* conforme seu diâmetro aumenta (BUFFAT; BOREL, 1976; CASTRO et al., 1990). Isto ocorre pois devido ao seu menor número de coordenação, átomos superficiais são mais fracamente ligados ao material do que átomos volumétricos, fazendo com que a temperatura de fusão diminua.

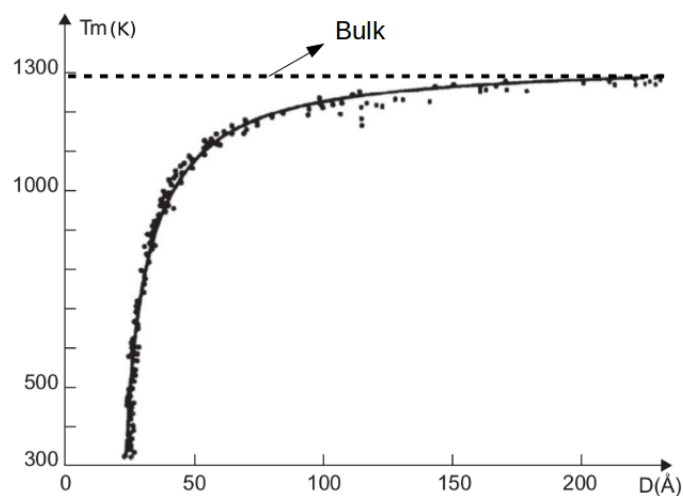


Figura 2 – Temperatura de fusão de nanopartículas de Au em função do diâmetro. Pontos representam dados experimentais, linha contínua o ajuste de uma curva sobre os dados e a linha tracejada a temperatura de fusão aproximada em *bulk*. Adaptado de (BUFFAT; BOREL, 1976).

Outro efeito de tamanho e geometria típico de nanopartículas metálicas é a ressonância de plasmons de superfície localizados (AMENDOLA et al., 2017). Os plasmons de superfície localizados, são oscilações coletivas de elétrons livres na superfície de nanopartículas metálicas, que ocorrem devido à ressonância dos elétrons com o campo elétrico de uma radiação eletromagnética. Os plasmons de superfície localizados não são excitações permitidas em metais *bulk* e ocorrem, apenas na nanoescala, ao incidir luz sobre metais de dimensões inferiores ao comprimento de onda da luz incidente, gerando o confinamento da oscilação da nuvem eletrônica na estrutura. Essas oscilações coletivas de elétrons na superfície das nanopartículas são excitações classificadas como uma quasipartícula e podem ser descritas como uma densidade de carga negativa oscilando ao redor de um núcleo positivo e no sentido contrário ao campo elétrico ressonante, conforme ilustrado na figura 3.

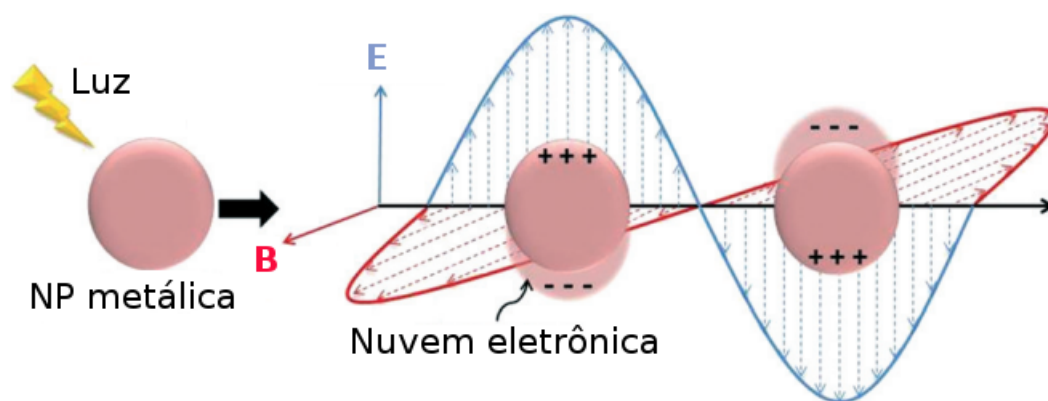


Figura 3 – Representação esquemática da ressonância de plasmons de superfície em nanopartículas metálicas. Adaptado de (PEIRIS; MCMURTRIE; ZHU, 2016).

Devido à ressonância de plasmons de superfície, nanopartículas metálicas podem apresentar absorção no espectro UV-Visível e portanto, a existência de plasmons pode ser detectada por espectroscopia UV-Vis. No caso de nanopartículas de Ag, Au e Cu que, para um tamanho de 20 nm e geometria esférica, apresentam bandas de absorção nos comprimentos 400 nm, 530 nm e 580 nm respectivamente, figura 4.

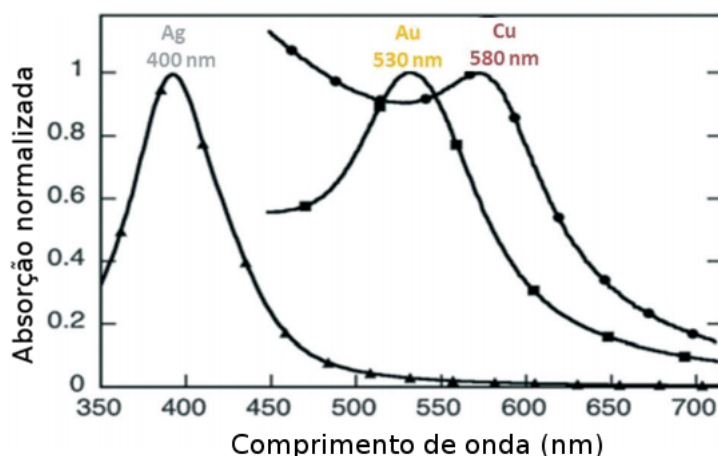


Figura 4 – Bandas de absorção de plasmons de superfície de nanopartículas de Ag, Au e Cu. Adaptado de (SCAIANO; STAMPLECOSKIE; HALLETT-TAPLEY, 2012).

A absorção de luz em diferentes comprimentos de onda para diferentes elementos, é um exemplo de como as propriedades destes nanossistemas são sensíveis à composição química. Assim, ao misturar elementos em uma mesma estrutura, gerando nanopartículas multimetálicas, diferentes propriedades físicas e químicas podem ser obtidas, como por exemplo a ação catalítica de nanopartículas de ligas metálicas da ordem de 5 nm de RhAu e RhAg exemplificada na figura 5.

As nanopartículas de RhAg e RhAu, dependendo de sua composição química e quando comparadas com nanopartículas compostas apenas por Rh, apresentam uma maior conversão de moléculas por sítio ativo por segundo (*Turnover frequency*), ou seja, uma maior atividade catalítica na reação de hidrogenação. Nesse caso, a hidrogenação ocorre quando uma molécula é obtida pela adição de hidrogênio a uma cadeia carbônica insaturada - que possuem ligações duplas ou triplas entre os carbonos.

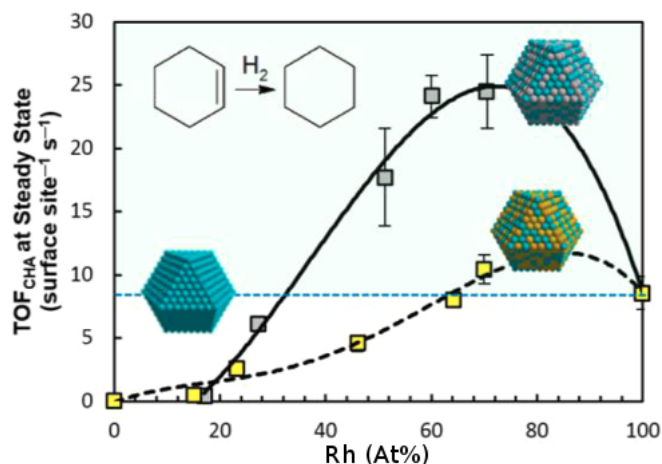


Figura 5 – Atividade catalítica de NP's na reação de hidrogenação de ciclohexano à 25.0 °C, em função da porcentagem atômica de Rh para NP's de RhAg (cinza) e de RhAu (amarelo) em comparação com Rh pura (linha tracejada azul). Adaptado de (GARCÍA et al.,).

Portanto, assim como é feito para as ligas metálicas macroscópicas, ao combinar as propriedades dos elementos na nanoescala é possível a exploração de novas possibilidades, misturando elementos metálicos e formando sistemas multimetálicos de diversas estruturas e morfologias.

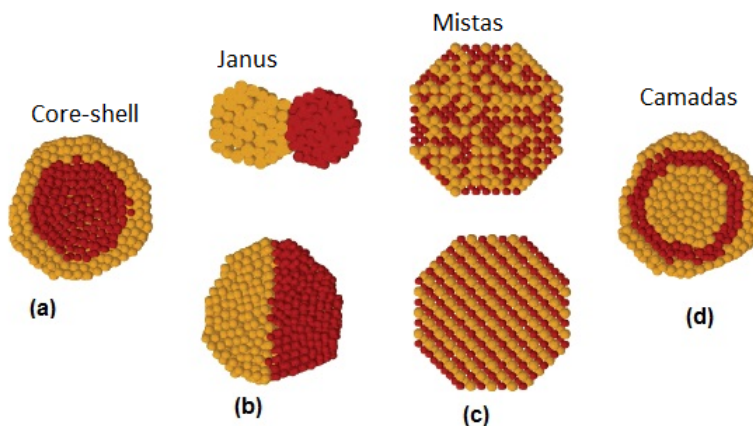


Figura 6 – Esquemático de diferentes morfologias de nanopartículas bimetálicas. Adaptado de (FERRANDO; JELLINEK; JOHNSTON, 2008)

Assumindo o sistema binário, para efeito de ilustração, a figura 6 apresenta um esquema de diferentes possibilidades para a morfologia de nanopartículas bimetálicas, podendo ser como em: (a) uma partícula *Core-Shell*, com um elemento compondo um núcleo e um segundo elemento compondo uma casca envolvendo o núcleo; (b) partículas Janus (em referência ao deus romano de duas cabeças), onde os elementos separados

em duas fases distintas podem estar totalmente segregados ou formando uma interface bem definida; (c) partículas mistas de ligas metálicas, onde os elementos se misturam totalmente, formando nanoligas que podem possuir os átomos quimicamente desordenados ou ordenados; (d) formando estruturas do tipo de camadas com os elementos formando um núcleo com camadas intercaladas envolvendo-o.

Os mesmos padrões morfológicos podem ser observados, em sistemas com mais de dois elementos. No entanto, ao aumentar a quantidade de elementos, se torna mais complexo prever quais tipos de estruturas as nanopartículas podem assumir. Inclusive, podem possuir diferentes fases no mesmo objeto, misturando os diferentes padrões morfológicos apresentados na figura 6. Chen *et al* (CHEN et al., 2016) publicou um trabalho em que nanopartículas multimetálicas compostas por Ag, Au, Cu, Ni e Co apresentam ao mesmo tempo morfologia mistas e Janus formando uma heteroestrutura, como ilustrado pela figura 7. A nanopartícula à princípio apresenta, através da imagem de STEM-HAADF, contraste químico entre duas regiões, revelando uma nanopartícula do tipo Janus. No entanto, ao utilizar espectroscopia com resolução espacial para gerar mapas elementais pela técnica STEM-EDS, é possível obter informações complementares que indicam a formação de ligas metálicas de AgAu, AuCu e CoNi em três domínios diferentes da nanopartícula.

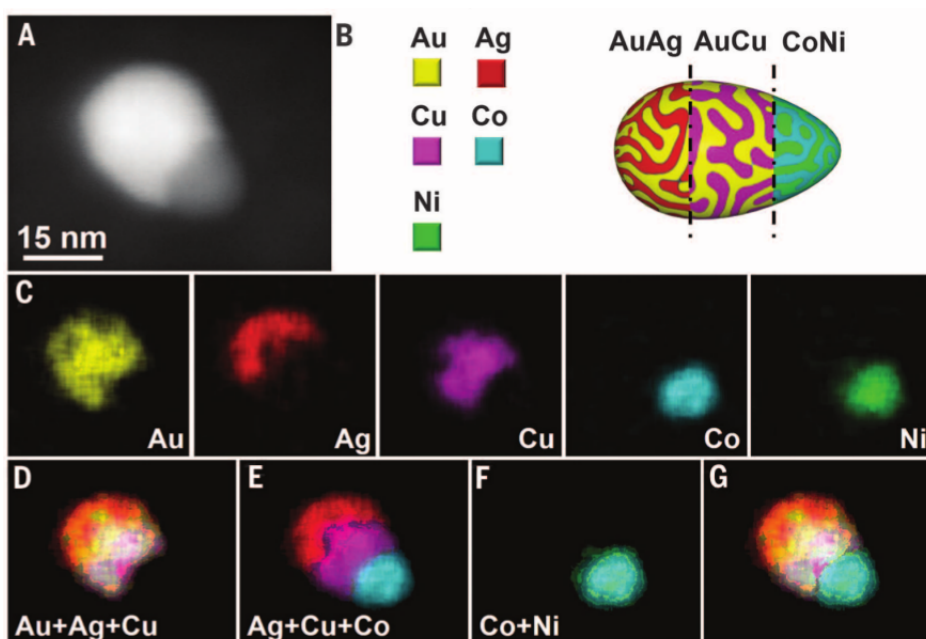


Figura 7 – (A) Imagem STEM-HAADF de uma NP de AgAuCuCoNi típica 19% Au, 24% Ag, 28% Cu, 14% Co, 15% Ni). (B) Ilustração esquemática da estrutura da NP de AgAuCuCoNi de (A). A NP segrega-se em três fases de ligas AgAu, AuCu e CoNi. (C a G) Mapeamentos elementais STEM-EDS da NP de (A). (C) Distribuição de cada metal na NP. (D) Sobreposição dos elementos Au, Ag, e Cu. (E) Sobreposição dos elementos Ag, Cu, e Co. (F) Sobreposição dos elementos Co e Ni (G) Sobreposição de todos os cinco elementos. Extraído de (CHEN et al., 2016).

Ainda neste trabalho, Chen (CHEN et al., 2016) mostrou que a formação de nanoligas dependem da composição química, onde para o caso de nanopartículas de AgAuCu a nanopartícula modifica a formação de liga metálica ao enriquecer o sistema em Au como mostrado pela figura 8.

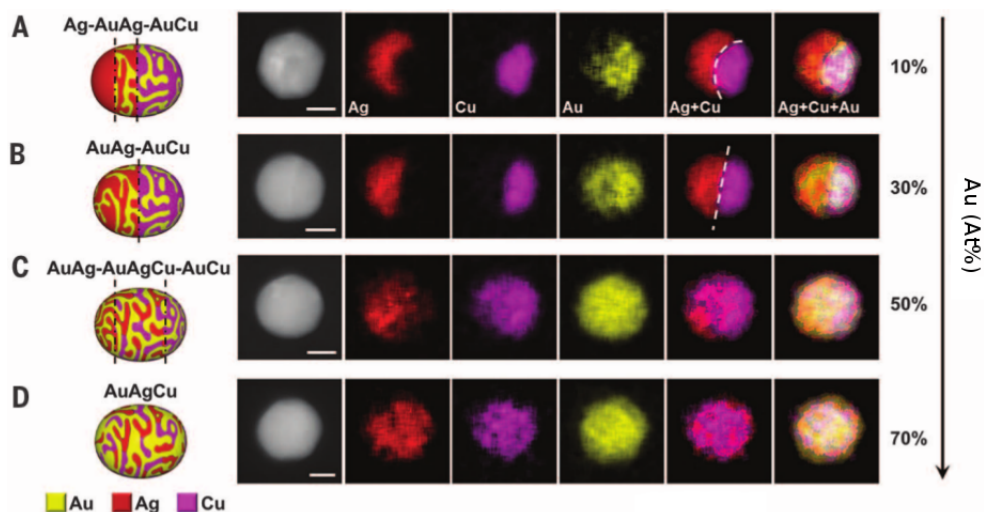


Figura 8 – (A a D) Ilustração esquemática, imagens STEM-HAADF, e mapa elemental STEM-EDS de quatro NP's representativas de AuAgCu NPs com diferentes quantidades de Au. De (A) até (D), a porcentagem de Ag e de Cu são iguais em cada NP e a porcentagem de Au aumenta gradativamente de 10% até 70%. A linha tracejada em (A) e (B) indica a posição da interface das fases. Barras de escala de 20 nm. Adaptado de (CHEN et al., 2016).

Na figura 8, pelas imagens de STEM-HAADF as nanopartículas de AgAuCu parecem um sistema homogêneo, mas quando analisadas por seus mapas elementais adquiridos por STEM-EDS, é possível verificar que com uma porcentagem atômica de 10% de Au, o sistema se separa ao menos em duas fases distintas de Ag e AuCu, revelando-se um sistema heterogêneo e, ao aumentar gradativamente a porcentagem de átomos de Au, a miscibilidade aumenta proporcionalmente, até a formação de uma nanoliga completa de AgAuCu em 70% de Au.

2.2 Imagens espectrais em microscopia eletrônica

Microscopia eletrônica, tanto o modo varredura quanto o modo transmissão, utilizam feixes de elétrons como fonte de iluminação. Deste modo, a possibilidade de gerar uma sonda de elétrons permite a obtenção de informação analítica com alta resolução espacial, levando a estimativas de propriedades físicas e de composição química (WILLIAMS et al., 2009). Assim, ao varrer a amostra ponto a ponto, com uma sonda nanométrica de elétrons, imagens espectrais podem ser geradas ao associar a cada pixel um espectro de contagens, tornando portanto a intensidade dos mapas elementais função de duas

coordenadas espaciais e uma terceira em energia, como segue ilustrado na figura 9. Esse conjunto de dados hiperspectral, devido à sua estrutura, é popularmente chamado de cubo de dados. Em microscopia eletrônica analítica, tipicamente, são utilizadas as técnicas de espectroscopia EDS e EELS (ALLEN et al., 2010), para gerar as imagens espectrais. Projetando assim, mapas elementais da amostra ao selecionar as contagens de canais em energia, correspondentes a assinatura química do material analisado.

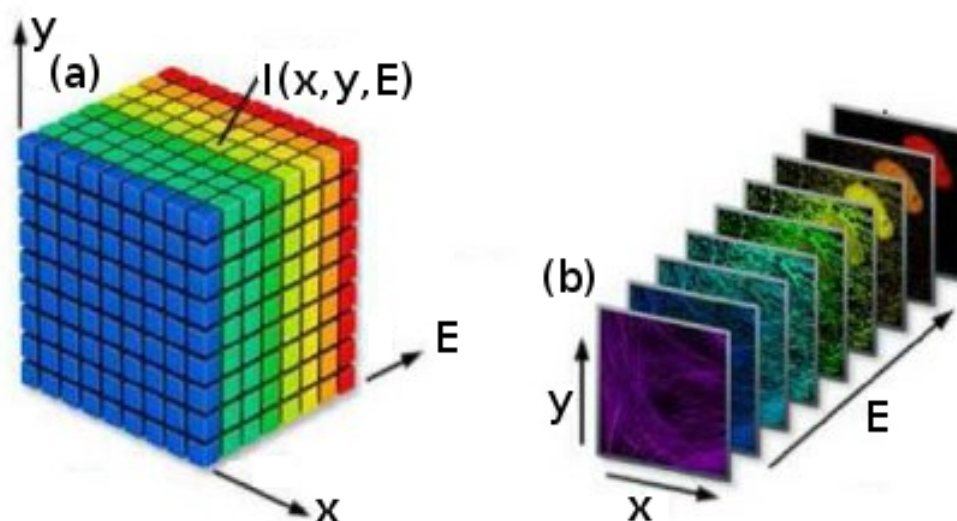


Figura 9 – Representação esquemática de (a) um cubo de dados de coordenadas (x,y,E) e (b) Sequência de planos transversais do cubo de dados, representando imagens cujas intensidades por pixel, são definidas por contagens de canais em energia. Extraído e adaptado de <<http://zeiss.magnet.fsu.edu/tutorials/spectralimaging/lambdastack/indexflash.html>>, em 21/11/2018.

A análise desses dados hiperspectrais, mais especificamente de EDS, pode fornecer tanto informações qualitativas quanto quantitativas do material, sendo assim uma importante ferramenta em nanociência. Porém, construir imagens espectrais é um processo demorado e dependendo da situação, pode levar horas para gerar um único mapa elemental da amostra com informação livre de ruído. E esse longo tempo de aquisição, pode levar à indução de artefatos decorrentes do dano à amostra, causado pelo feixe de elétrons.

Assim, dadas às limitações de tempo na aquisição dos dados, mapas elementais geralmente não eram apreciados para quantificação. Mas essa realidade vem se transformando com a evolução dos sistemas de aquisição e de detectores com maior ângulo de coleção (NEWBURY, 2005), que permitem a aquisição de mais contagens em um menor período de tempo. Com isso, o volume de dados é incrementado, aumentando tanto a quantidade de informação útil quanto de informação redundante fazendo com que surja a necessidade do uso de novas técnicas de análise de dados para a separação da informação relevante do ruído, levando a microscopia eletrônica analítica para o campo do *big datas* (BELIANINOV et al., 2015).

Nesse contexto, ferramentas de *machine learning*, como análise de componentes principais ou do inglês PCA (*Principal Component Analysis*), vem sendo utilizadas como instrumentos de redução de ruído em dados hiperspectrais de microscopia eletrônica (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003; WATANABE et al., 2006). Essas técnicas tem permitido a redução do tempo de aquisição para a obtenção de dados, reduzindo a incerteza associada às quantificações e melhorando a relação sinal ruído das imagens espectrais e consequentemente, obtendo maior qualidade na segmentação de objetos e separação de fases (PARISH; BREWER, 2010). Portanto, a análise quantitativa de mapas elementais se torna uma opção de caracterização de grande valor para nanociência, permitindo, através do uso de ferramentas adequadas, análises quantitativas automatizadas e de alta precisão.

Além do uso de PCA, outras técnicas de *machine learning*, como ICA (Independent Component Analysis), tem sido utilizadas na análise quantitativa de mapas elementais (ROSSOUW et al., 2015), onde nanopartículas *Core-Shell* são analisadas por STEM-EDS e processadas por PCA e ICA, levando a identificação automática de uma componente espectral associada aos núcleos das partículas, uma componente associada à casca e outra ao fundo, conforme mostrado na figura 10.

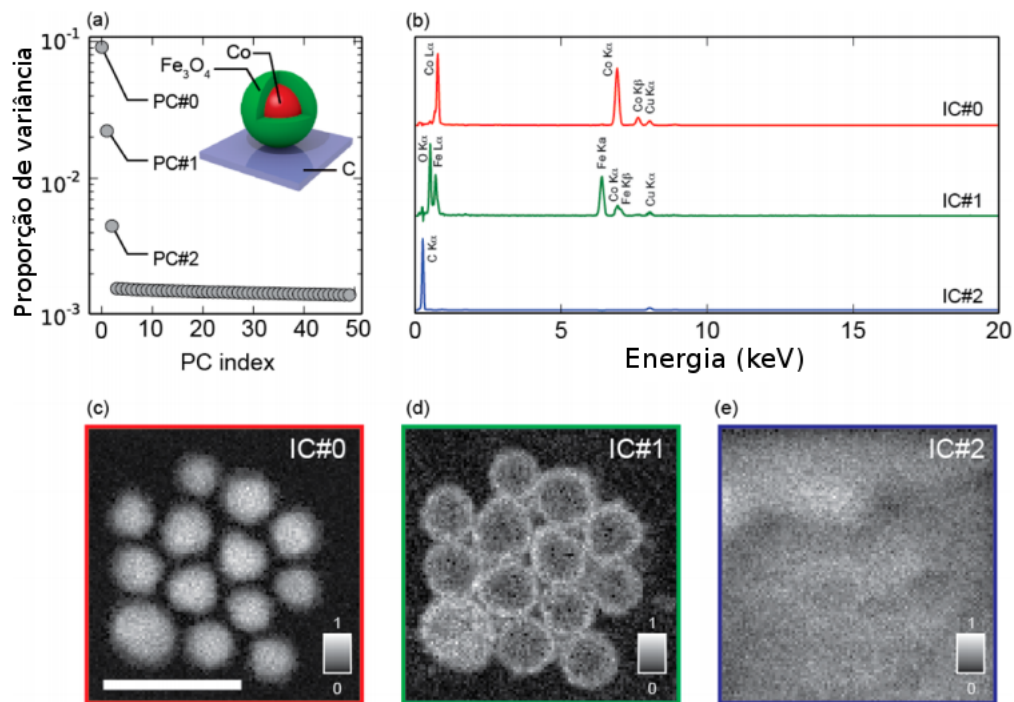


Figura 10 – Resultados de identificação de fases por PCA e ICA em imagem espectral de nanopartículas *core-shell* $Co@Fe_3O_4$. (a) Proporção de variâncias de 50 componentes determinadas por PCA, (b) componentes independentes calculadas à partir das componentes principais do PCA, contendo as linhas de Raio X para os elementos presentes. Mapas das componentes independentes (c-e) revelando que (c) IC#0 correspondente aos núcleos, (d) IC#1 às cascas, e (e) IC#2 ao fundo de carbono da grade de microscopia. Escala 50 nm e barra de cor normalizada. Adaptado de (ROSSOUW et al., 2015).

Basicamente, o PCA busca determinar componentes principais que melhor representem o conjunto de dados original. As componentes principais, são utilizadas como uma base ortogonal para reconstrução do conjunto e o critério que determina as componentes relevantes são as variâncias associadas à elas. Deste modo, as variâncias na figura 10 (a) são valores associados às componentes que carregam informação que representa o sistema. Nesse caso, as três primeiras variâncias que se sobressaem são as variâncias que melhor representam o sistema. As componentes principais, podem ser utilizadas para reconstruir o conjunto de dados original reduzindo seu ruído, mas é complicado associar as componentes principais individualmente à algum significado físico. Em seguida, o ICA utiliza o resultado da otimização do PCA para atribuir significado físico às componentes geradas e selecionar os sinais relevantes da imagem espectral que são mostrado na figura 10 (b) como espectros com linhas características dos elementos pertencentes à amostra IC#0, IC#1 e IC#2. Associado a cada um dos espectros das componentes independentes, estão os sinais das três fases distintas pertencentes à amostra analisada, revelando com resolução espacial a seleção dos sinais na figura 10 (c-e). Portanto, o método permite a seleção automática das intensidades correspondentes às diferentes fases, sem nenhum viés, pois não requer nenhuma informação *a priori* dos elementos pertencentes ao sistema, utilizando como único parâmetro de entrada o número de componentes principais obtido por PCA.

Ao estabelecer este método, no trabalho de Rossouw (ROSSOUW et al., 2015), os sinais extraídos por ICA correspondentes às diferentes fases da amostra, puderam ser utilizados para separar sinais e quantificar a composição química de uma amostra de nanopartículas *Core-Shell FePt@Fe₃O₄*. A composição química do núcleo de FePt foi quantificada, à partir da componente IC#0, que corresponde ao sinal do núcleo, independente do sinal da casca de *Fe₃O₄* presente na componente IC#1. Para verificar a qualidade da quantificação, utilizando as componentes independentes, a composição química de FePt medida através da componente IC#0, é comparada com a quantificação da composição química dos núcleos antes da adição da casca, conforme segue na figura 11. Onde os pontos são as medidas feitas para as nanopartículas de FePt anterior à adição das casca de *Fe₃O₄*, e as linhas tracejadas representam os valores obtidos através do uso de ICA para separação de sinais.

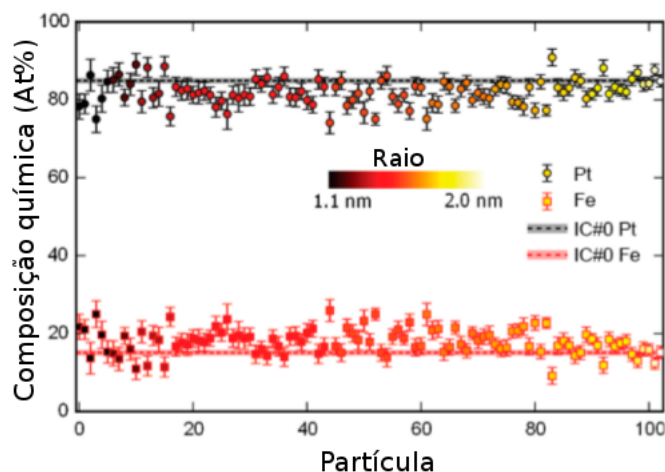


Figura 11 – Comparação da quantificação da composição de nanopartículas FePt anterior à adição da casca Fe_3O_4 , com a quantificação pela componente IC#0 após a adição da casca. Adaptado de (ROSSOUW et al., 2015)

Com mapeamento elemental convencional, essa separação não poderia ser feita, pois não seria possível separar com precisão o sinal de Fe pertencente ao núcleo de FePt, do sinal de Fe pertencente à casca de Fe_3O_4 , prejudicando assim a quantificação localizada da composição química da nanopartícula.

2.3 Nanopartículas bimetálicas de AgAu

A liga metálica de AgAu, historicamente conhecida por "Eletro", proporcionou à humanidade suas primeiras experiências com metalurgia. Hoje, devido a nanociência, possui potenciais aplicações como catalisador na reação de oxidação de CO (WANG; CHANG; MOU, 2005) e em medicina para imagem e tratamento de células cancerígenas (SHI et al., 2014).

Propriedades óticas de nanopartículas de AgAu tem sido investigadas em função de sua composição química, geometria e tamanho (GUISBIERS et al., 2016), revelando a importância destes parâmetros na resposta ótica do material. Na figura 12, espectros de foto-emissão de nanoligas AgAu adsorvidas em um filme fino de Al_2O_3 (BENTEN et al., 2005), são utilizados para revelar que com o aumento da concentração de átomos de Au no sistema, ocorre o deslocamento do pico de emissão para o vermelho. Nesse experimento, a foto-emissão correspondente à excitação de plasmons de superfície acontece em função da porcentagem atômica de Ag (0% a 100%), ilustrando a capacidade de variar a resposta ótica das nanopartículas de AgAu variando sua composição química.

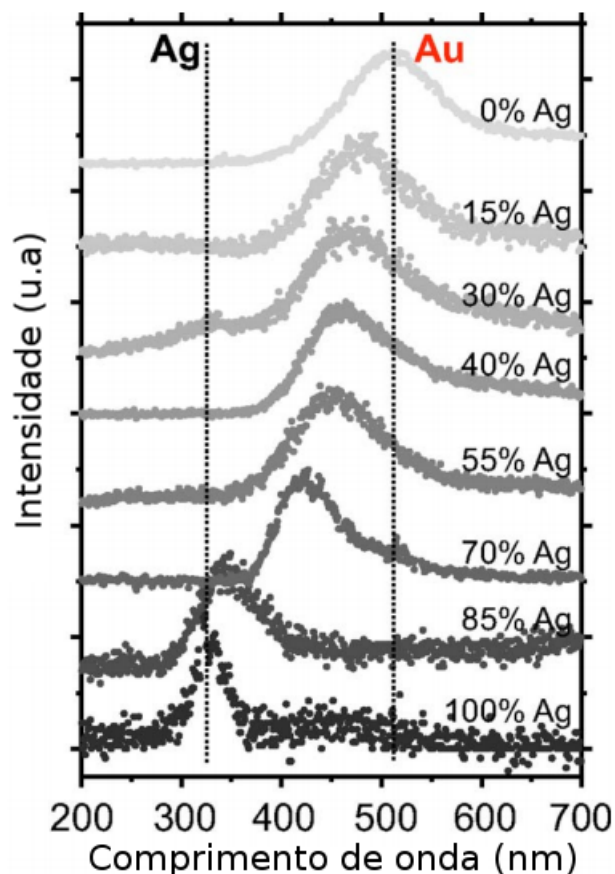


Figura 12 – Espectro de foto-emissão normalizado obtido por excitação de plasmons de superfície, via injeção de elétrons pela ponta de um STM (*Scanning Tunneling Microscope*). Amostras de ligas de AgAu depositadas em filme fino de Al_2O_3 com diferentes porcentagens de átomos de Ag. Adaptado de (BENTEN et al., 2005)

Em *bulk* Ag e Au são metais nobres altamente miscíveis devido aos parâmetros de rede serem similares, 4.09 Å e 4.08 Å respectivamente. Assim, formam ligas metálicas para qualquer composição química com pouca ou nenhuma segregação. Já para o caso de nanopartículas, dependendo do método de síntese, os sistemas podem ser ligas metálicas ou de morfologia *Core-Shell*, possuindo suas propriedades dependentes dessas estruturas (WILCOXON; ABRAMS, 2006; LI et al., 2008).

Nanopartículas de ligas metálicas mistas de AgAu, apresentam segregação radial de algum dos elementos, ou seja, para uma nanopartícula bimetalica mista, um dos elementos pode ser radialmente enriquecido, apresentando maior concentração na superfície do que no núcleo. Isso também já foi observado em estruturas *Core-Shell* para nanopartículas de AgAu com núcleo de Au, onde à temperatura ambiente ocorre difusão dos átomos levando a formação de ligas metálicas espontaneamente (SHIBATA et al., 2002). A formação de ligas metálicas em nanopartículas de AgAu inicialmente *Core-Shell*, também pode ser induzida termicamente ao aquecê-las (LASSERUS et al., 2018), promovendo a difusão dos

átomos mesmo quando o núcleo é de Ag e a casca de Au.

No trabalho de Guisbiers (GUISBIERS et al., 2016) é proposto que, no caso de nanoligas bimetálicas de tamanhos entre 4-10 nm, o que determina a segregação dos átomos de determinado elemento na superfície é sua temperatura de fusão. Quanto menor a temperatura de fusão, mais favorável a ocorrência da segregação. Para o caso das nanoligas de AgAu, como Au e Ag possuem temperaturas de fusão similares, a energia de superfície é que define a segregação. Então, como Ag possui menor energia de superfície que Au (GUISBIERS et al., 2016), a nanopartícula é enriquecida de átomos de Ag na superfície, como pode ser verificado na figura 13. Onde é possível observar qualitativamente, através de mapas elementais, a maior concentração de Ag na superfície da nanopartícula.

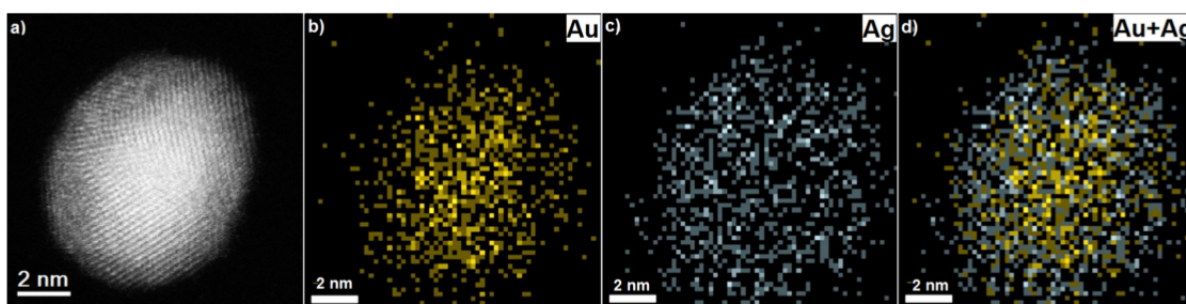


Figura 13 – (a) Imagem STEM-HAADF de uma nanopartícula de AgAu de composição química 1:1 e tamanho aproximado de 9 nm. (b,c e d) Mapas elementais EDS de Au, Ag, e sobreposição respectivamente. Regiões amarela no mapa indicam presença de ouro e região cinza indica presença de prata. A sobreposição evidencia o enriquecimento de prata na superfície. Extraído de (GUISBIERS et al., 2016).

Análises qualitativas de mapas elementais, como feito na figura 13, tem sido importantes ferramentas de caracterização da distribuição elemental na amostra. No entanto, em muitas situações é importante maior refinamento dos dados à partir de uma análise quantitativa da distribuição de elementos nos nanossistemas, como por exemplo nas nanopartículas de AuAg. Pois deste modo, seria possível verificar com maior precisão a segregação de Ag na superfície.

3 Materiais e Métodos

Nessa seção serão apresentadas as técnicas de síntese de nanopartículas de AgAu utilizando agregação em gás e de caracterização por microscopia eletrônica de transmissão. Será também discutida a metodologia escolhida para o processamento dos dados utilizados para se estudar este sistema.

3.1 Fonte de agregados atômicos e nanopartículas

Na fonte de agregados metálicos usada neste trabalho, as nanopartículas são sintetizadas por vaporização e posterior agregação de metais ou ligas metálicas. Esta fonte de nanopartículas é inspirada nos instrumentos desenvolvidos por Haberland (HABERLAND et al., 1994) e Hillenkamp (HILLENKAMP; DOMENICANTONIO; FELIX, 2006), onde a agregação em buffer de gás utiliza um *magnetron sputtering* como gerador da nuvem de átomos que serão agregados. No entanto, utiliza um *magnetron sputtering* de simetria cilíndrica (SÁ et al., 2014), de modo que seja possível utilizar fios metálicos como alvo.

A fonte de nanopartículas, esquematicamente ilustradas pela figura 14, é constituída por um *magnetron sputtering* como fonte de átomos, câmara de agregação por gás, lentes eletrostáticas para controle do feixe de íons, espectrômetro por tempo de voo (TOFMS, do inglês *Time of Flight Mass Spectrometer*) para controle de massa e câmara de deposição para preparo de amostras.

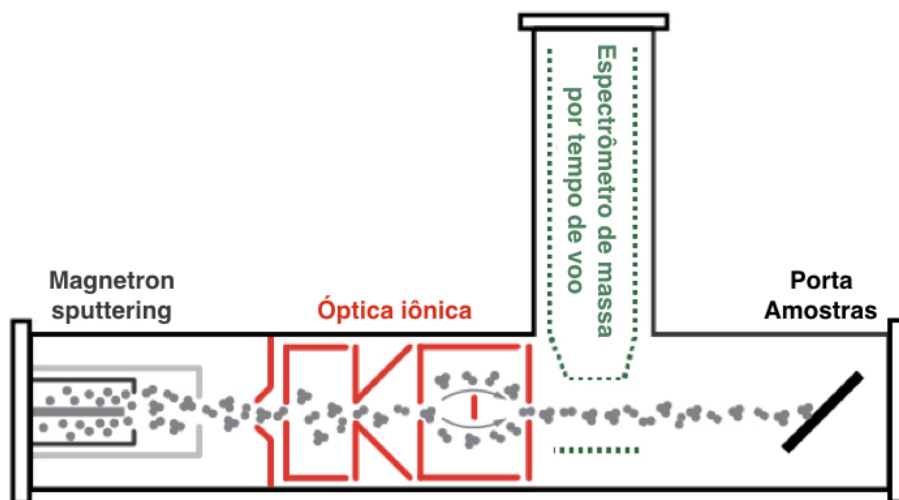


Figura 14 – Representação esquemática de uma fonte de agregados utilizada para síntese de nanopartículas por agregação em gás (HUTTEL, 2017).

A nuvem atômica gerada pela fonte de átomos é carregada por um fluxo de gás

(He e/ou Ar), que através de múltiplas colisões promove a agregação dos átomos em dímeros, que por sua vez, atuam como sementes da nucleação de agregados precursores da formação de nanopartículas (HUTTEL, 2017). A formação destes dímeros só ocorre devido a introdução do fluxo de gás inerte, pois a formação de um dímero necessita de um terceiro átomo, no caso os átomos de He ou Ar, para remover o excesso de energia, permitindo a ligação dos átomos em uma condição estável, conforme mostrado pelas equações (3.1) e (3.2) à seguir



A partir dos dímeros, a nucleação dos átomos pode ocorrer, sendo a nucleação definida como a primeira formação irreversível de núcleos estáveis. Com a formação desses núcleos, átomos vão agregando na estrutura que também coalesce com outras estruturas similares, crescendo assim as nanopartículas na condição de maior estabilidade (menor energia), conforme ilustra a figura 15, onde as esferas vermelhas representam os átomos utilizados para a formação dos agregados e as verdes o gás de arraste residual.

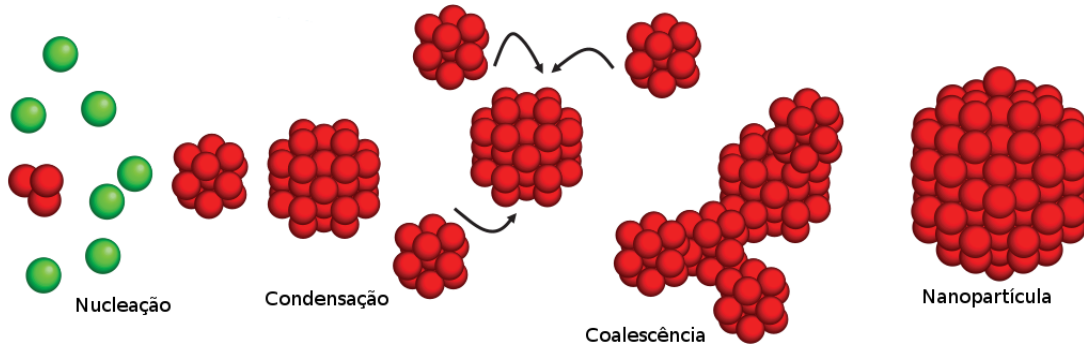


Figura 15 – Esquemático do crescimento de nanopartículas por agregação em gás, adaptado de (HUTTEL, 2017).

Para que a condensação dos átomos ocorra de maneira eficiente, implicando na agregação, é necessário resfriar o sistema. Assim, induzindo uma supersaturação no gás atômico, ou seja, as condições de pressão e temperatura à que a nuvem atômica está sujeita, são tais que quando os átomos colidirem, a taxa de agregação é maior que a de destruição. Esse processo de agregação ocorre em avalanche, ou seja, após iniciado ocorre espontaneamente com a diminuição da energia livre de Gibbs. A teoria de formação de *clusters* atômicos ainda possui questões em aberto, mas é possível apresentar uma descrição qualitativa que explique a termodinâmica de formação das nanopartículas à partir da

minimização da energia livre de Gibbs, segundo a teoria clássica da nucleação (HUTTEL, 2017).

Assumindo dois casos com um gás com $N = n_1 + n_2$, onde no primeiro caso os átomos estão todos na fase vapor e em um segundo caso com n_1 átomos na fase vapor e n_2 átomos formando uma gota líquida, é possível escrever a energia livre de Gibbs para as duas situações e avaliar a sua variação,

$$G_v = (n_1 + n_2)\mu_v(p, T) \quad (3.3)$$

$$G_g = n_1\mu_v(p, T) + n_2\mu_l(p, T) + 4\pi R^2\sigma \quad (3.4)$$

onde $\mu_v(p, T)$ e $\mu_l(p, T)$ são os potenciais químicos da fase vapor e da fase líquida respectivamente e σ é a energia de superfície. Assim, avaliando a variação da energia livre de Gibbs de uma transição da fase vapor para a formação da gotícula tem-se que:

$$\Delta G = G_g - G_v = 4\pi R^2\sigma + n_2(\mu_l - \mu_v) \quad (3.5)$$

Dado que $\mu_v - \mu_l = k_B T \ln(\phi_k)$ onde $\phi_k = \frac{P_k}{P_v}$ com P_k e P_v , sendo a pressão de supersaturação e pressão de vapor respectivamente, tem-se que

$$\Delta G = 4\pi R^2 - n_2 k_B T \ln(\phi_k) \quad (3.6)$$

Como n_2 pode ser escrito em termos do volume da gotícula e do volume dos átomos V_a que compõe a gotícula, conclui-se que a variação da energia livre de Gibbs é dada por:

$$\Delta G = 4\pi R^2 - \frac{4\pi R^3}{3V_a} k_B T \ln(\phi_k) \quad (3.7)$$

Com a expressão (3.7), é possível avaliar a variação da energia livre de Gibbs para dois regimes diferentes, onde $\phi_k < 1$ e $\phi_k > 1$, conforme segue na figura 16.

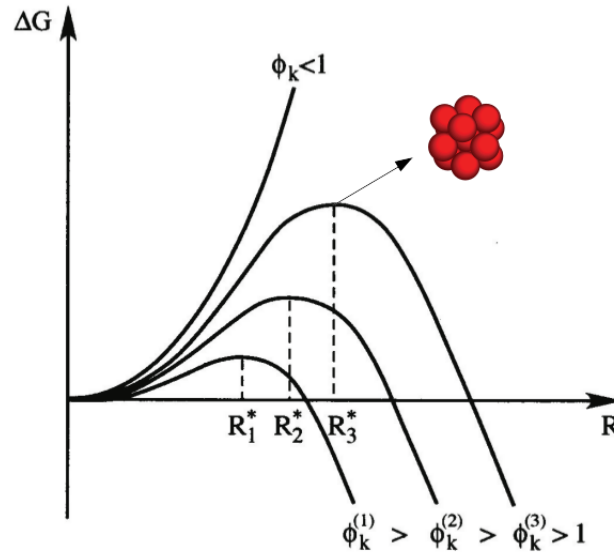


Figura 16 – Variação da energia livre de Gibbs para a formação de agregados atômicos de raio R para diferentes superssaturações ϕ_k . Extraído e adaptado de (TAVARES, 2013).

No regime $\phi_k < 1$ existe um aumento da energia livre de Gibbs que cresce para qualquer valor de R , sendo assim, não ocorrerá agregação neste regime. Já no regime onde $\phi_k > 1$, a energia livre de Gibbs apresenta um ponto de inflexão para um raio crítico R^* , ou seja, à partir de um determinado tamanho, o processo de formação de nanopartículas entra em avalanche com a minimização da variação da energia livre de Gibbs. Portanto, para que o processo se torne eficiente, como já citado, é necessária a superssaturação do gás.

Uma vez iniciado o processo de agregação, quanto mais tempo o material pulverizado ficar na câmara de agregação, maior se tornará o agregado através de colisões com outros agregados, tornando possível controlar o tamanho do sistema gerado através do comprimento e da pressão da câmara de agregação, definindo assim, a distribuição de tamanhos das partículas produzidas.

Deste ponto portanto, tem-se a formação de um jato de agregados arrastados pelo fluxo de argônio, este jato passa por uma lente eletrostática do tipo *Skimmer*, que tem como função selecionar agregados colimando-os em um feixe de alguns milímetros de diâmetro, tal ferramenta proporciona o início de um processo de controle sobre as nanopartículas geradas e pode ser visualizada na figura 17, onde os componentes internos da fonte de nanopartículas é esquematizado para melhor compreensão do processo de síntese.

O feixe então passa por uma lente do tipo *Einzel* para focalizá-lo, isso faz com que as partículas carregadas sejam defletidas e as neutras continuem em movimento retilíneo. Em seguida o feixe passa por uma *Bessel Box* que retém, através de um *stopper* de 3 mm de diâmetro, o feixe neutro e permite que a maior parte das partículas carregadas passem. Deste modo, o feixe passa por um novo conjunto de lentes eletrostáticas do tipo *Einzel*,

que tem como função focalizar novamente o feixe de íons. Tal processo de separação dos *clusters* neutros dos carregados, é importante para a caracterização pelo espectrômetro de massa perpendicular ao eixo principal da máquina, o uso de um pulsador eletrostático (*kicker*) que desvia o feixe de partículas em direção ao detector possibilitando determinar a massa por tempo de voo. Por fim, os agregados são depositados à uma energia de por volta de 100 eV, em um porta-amostras com substrato para a caracterização *ex situ*.

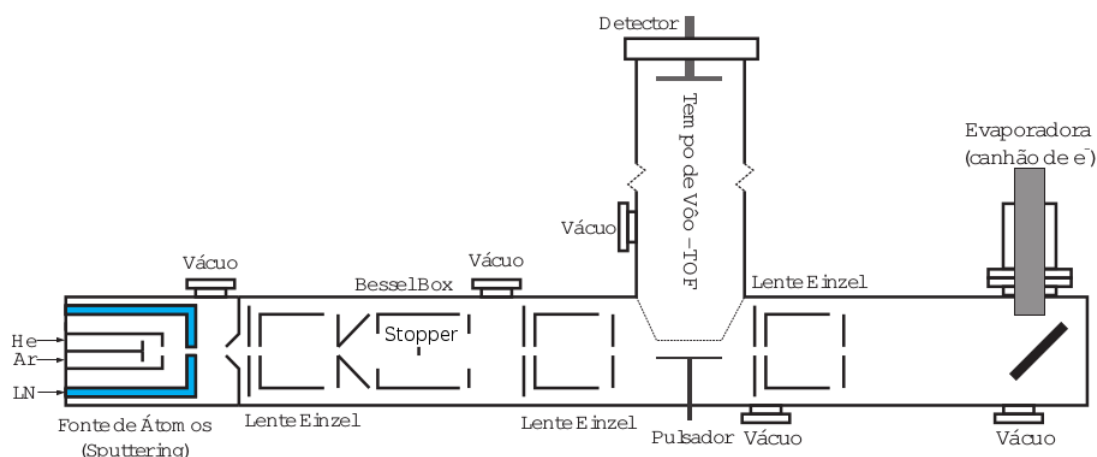


Figura 17 – Representação esquemática da fonte de agregados atômicos utilizada para a síntese das nanopartículas metálicas com detalhes de componentes do instrumento (TAVARES, 2013).

Durante a síntese das nanopartículas, como já citado, o tamanho das nanopartículas pode ser caracterizado *in situ* usando o espectrômetro de massa por tempo de voo. Parte do feixe de nanopartículas gerado, é pulsado verticalmente e assim, com a medida do tempo que leva para as nanopartículas chegarem no detector do espectrômetro, é possível estimar as suas massas calibrando o espectrômetro. Com as massas são estimados os tamanhos das nanopartículas, aproximando-as por esferas. Assim, um espectro de diâmetros das nanopartículas, pode ser visualizado durante a síntese, possibilitando o controle da distribuição de tamanho das partículas produzidas antes de serem preparadas para deposição e caracterização *ex situ*. Na figura 18 segue um espectro de diâmetros típico em sínteses utilizando a fonte de nanopartículas descrita anteriormente.

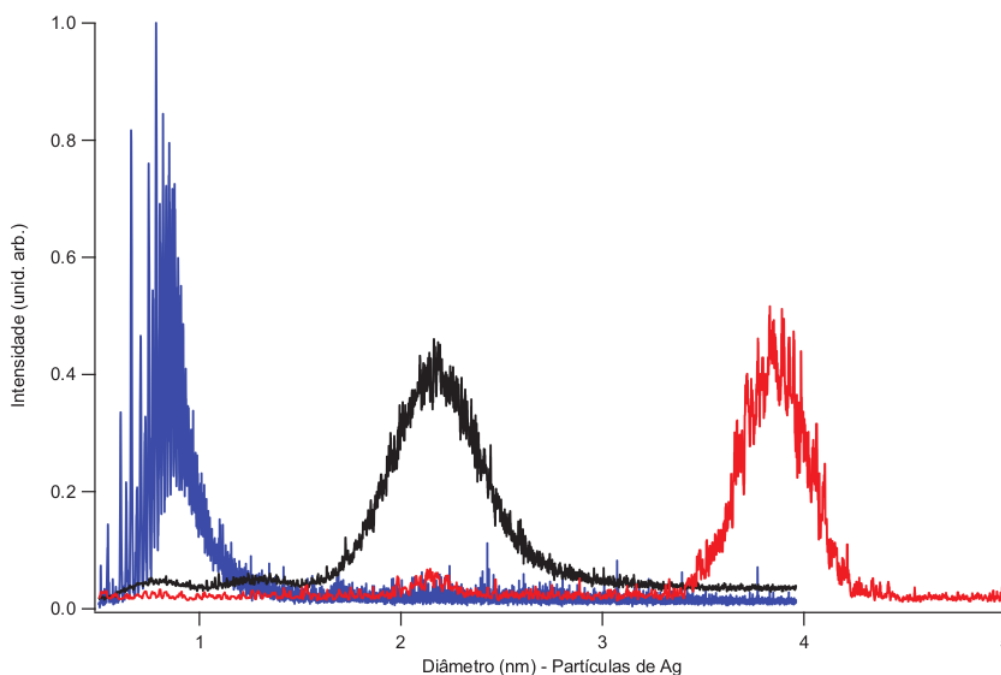


Figura 18 – Espectro de diâmetros de nanopartículas de Ag para três diferentes distribuições de tamanhos centradas em 0.8, 2.2 e 3.8 nm. (TAVARES, 2013).

Utilizando a fonte de agregados, foram fabricadas nanopartículas de AgAu em 3 diferentes composições com distribuições de tamanho semelhantes. Para se obter nanopartículas bimetálicas é usado mais de um elemento metálico como alvo para o *sputtering* cilíndrico. A figura 19 mostra uma ilustração do *magnetron sputtering* e uma imagem de um alvo metálico de AgAu típico. A esfera vermelha simboliza o gás ionizado e as esferas amarelas os átomos metálicos removidos na pulverização. O argônio é injetado pela base do magnetron cilíndrico e os íons gerados a partir do gás são acelerados em direção ao eixo do equipamento, por um campo elétrico existente devido a diferença de potencial entre um anodo (casca) e um cátodo (alvo metálico). O campo magnético gerado por uma bobina ou no caso, um eletroímã, é utilizado para aprisionar elétrons secundários para incrementar a ionização de átomos de Ar, otimizando a pulverização do alvo metálico. Assim, ao utilizar diferentes combinações de fios metálicos na composição do alvo, a área exposta de cada elemento muda, permitindo manipular a composição química da nuvem atômica precursora do crescimento das nanopartículas. Isso proporciona, não somente a síntese de nanopartículas de tamanho controlado, mas também de composição química controlada (SÁ et al., 2014). Além da área exposta, outro parâmetro a se considerar no controle da composição química é a taxa de pulverização (*sputter yield*) de cada elemento do alvo metálico. O *Sputter yield*, a grosso modo, é definido como o número de átomos removidos do material, para cada átomo de plasma incidente. No caso, para uma energia de pulverização de 100 eV para o íon de Ar, os valores estimados de *sputter yield* para Ag e Au são respectivamente 0.63 e 0.32 (LAEGREID; WEHNER, 1961).

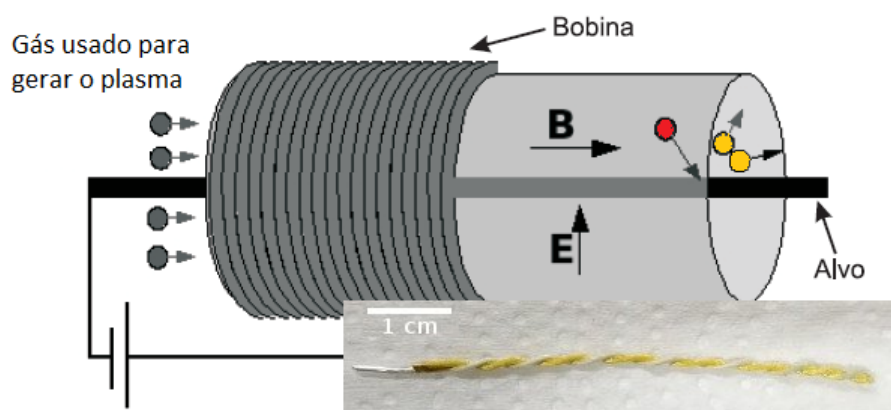


Figura 19 – Representação esquemática do *magnetron sputtering* cilíndrico (TAVARES, 2013) e em *inset* uma imagem de um alvo de fios metálicos de ouro e prata trançados.

Neste trabalho, o número de fios utilizados como alvo metálico da pulverização, combinados de três maneiras distintas, sendo estas 1:1, 1:2, 1:3 fios de ouro e prata respectivamente. As distribuições de tamanho das nanopartículas produzidas pela pulverização destes alvos foram o mais largas possível, na ordem de 2 nm - 9 nm, possibilitando quantificar a composição química de um número maior de exemplares de nanopartículas de diferentes tamanhos, tornando a amostragem mais representativa na demonstração do controle composicional da fabricação das nanopartículas. Adicionalmente, para realizar estes experimento o *stopper* não foi utilizado na deposição das partículas. Isto foi feito com o intuito de maximizar o número de partículas grandes (maiores que 4 nm) na deposição porque ao não utilizar o *stopper* como filtro de partículas carregadas, as partículas neutras e as partículas grandes que ficariam barradas pela lente podem ser depositadas.

3.2 Microscopia eletrônica de transmissão - TEM

O microscópio eletrônico de transmissão (*Transmission Electron Microscope* - TEM) é um microscópio no qual um feixe paralelo de elétrons é emitido na direção de uma amostra fina, interagindo com esta ao atravessá-la e assim funcionando como um sistema de projeção. Este instrumento é composto tipicamente por uma fonte de elétrons, lentes condensadoras, lentes objetivas, lentes intermediárias/projeção, aberturas, um porta amostras e um sistema de detecção como está ilustrado pelo diagrama na figura 20.

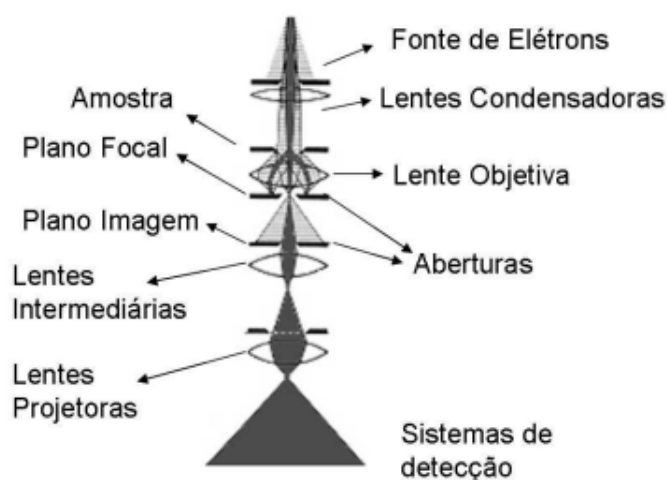


Figura 20 – Diagrama esquemático de um microscópio eletrônico de transmissão (TIZEI, 2008).

Devido às suas propriedades ondulatórias, elétrons quando acelerados por potenciais de algumas centenas de kV, possuem comprimentos de onda da ordem de alguns pm. Isto permite atingir resolução suficiente para investigar materiais na escala nanométrica e na escala atômica.

O feixe de elétrons pode interagir com a amostra de diversas maneiras, gerando diferentes tipos de sinais, que carregam informações estruturais, químicas e físicas da amostra. Por exemplo, ao incidir o feixe de elétrons na amostra, parte desse feixe será absorvido por ela, parte será retroespalhado e parte será transmitido. Dentre os elétrons transmitidos, alguns são espalhados elasticamente devido à interação com os núcleos atômicos; outros são espalhados inelasticamente pela eletrosfera. Além disso, há o feixe transmitido direto, composto pelos elétrons que pouco ou nada interagiram com a amostra. Destas interações, podem surgir sinais de radiação eletromagnética como o Raios X contínuo de frenagem ou *Bremstrahlung*, luz visível e Raios X característicos. Sendo esta última opção a de maior interesse neste projeto, pois permite a obtenção informação quantitativa da composição química da amostra (LORIMER, 1987), (CHEN et al., 2016).

No modo imagem, o microscópio eletrônico busca imitar a ótica convencional e, ao funcionar como um sistema de projeção, reproduz o plano objeto no plano imagem através do uso de uma lente objetiva, como representado esquematicamente pela figura 21. O plano imagem, através de lentes projetoras, é projetado no detector que gera digitalmente a imagem.

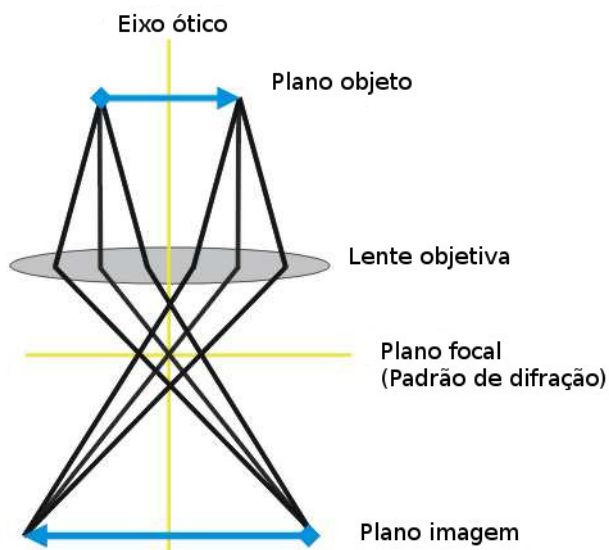


Figura 21 – Esquemático da geração de imagens de um TEM convencional, com a representação do plano objeto (amostra), plano focal (padrão de difração) e plano imagem. Extraído e adaptado de <http://www.microscopy.ethz.ch/TEM_imaging.htm>, em 14/10/2018.

Ao combinar o uso de lentes eletromagnéticas para controle do feixe de elétrons com aberturas e detectores, contraste pode ser gerado de diversas maneiras, o que permite o acesso à diferentes modos de operação para geração de imagens. Imagens de campo escuro ou DF (*Dark Field*) podem ser geradas selecionando com a abertura objetiva, conforme ilustrado pela figura 22, apenas o feixe espalhado elasticamente, ou seja, é gerado contraste entre o fundo e o material da amostra, sendo o fundo escuro e o material brilhante devido aos elétrons medidos serem os difratados pela estrutura cristalina.

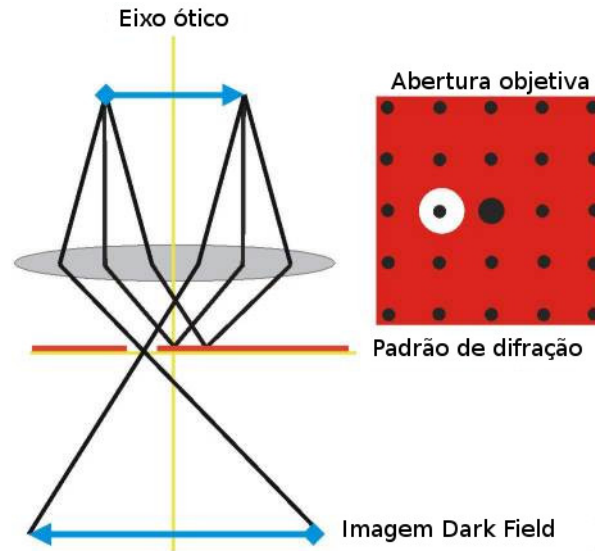


Figura 22 – Esquemático da geração de imagem Dark Field em um TEM convencional, com a representação da abertura objetiva selecionando o feixe difratado no plano focal. Extraído e adaptado de <http://www.microscopy.ethz.ch/TEM_DF.htm>, em 14/10/2018.

O contraste também pode ser gerado, utilizando o feixe direto e o feixe espalhado inelasticamente, conforme ilustrado pela figura 23. Neste caso a imagem gerada é de campo claro ou BF (*Bright Field*), onde o fundo é claro e o material é escuro devido ao feixe que está sendo medido perder intensidade ao atravessar o material, nesta condição a formação da imagem é sensível a efeitos de contraste de difração e de espessura, que causam enfraquecimento da intensidade do feixe.

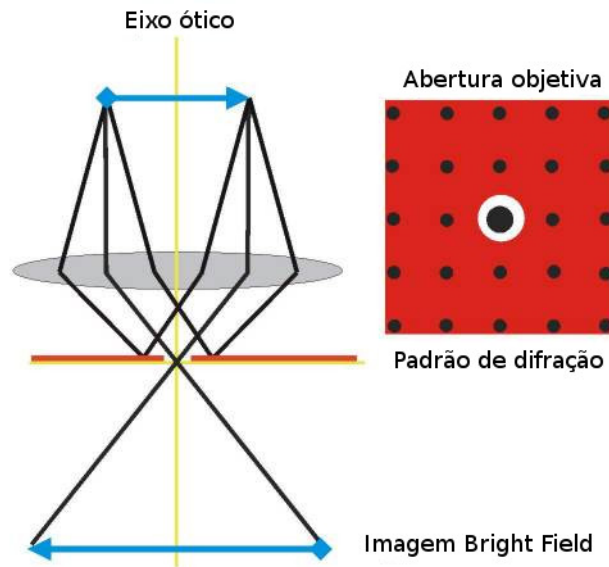


Figura 23 – Esquemático da geração de imagem Bright Field em um TEM convencional, com a representação da abertura objetiva selecionando o feixe direto no plano focal. Extraído e adaptado de <http://www.microscopy.ethz.ch/TEM_BF.htm>, em 14/10/2018.

Os feixes também podem ser utilizados combinados e assim, gerar imagens de interferência de muitos feixes, que são imagens de alta resolução, tipicamente conhecidas por imagens de HRTEM (*High Resolution Transmission Electron Microscopy*). Para gerar estas imagens a abertura objetiva seleciona tanto os feixes difratados quanto os diretos, conforme ilustra a figura 24.

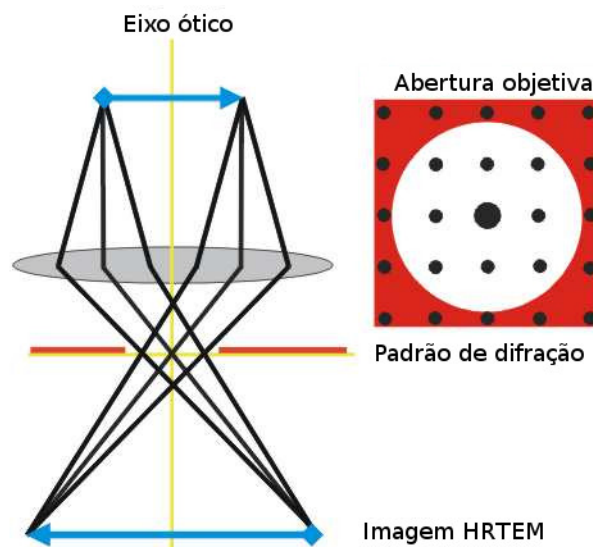


Figura 24 – Esquemático da geração de imagem HRTEM, com a representação da abertura objetiva selecionando o feixe direto e os feixes difratados no plano focal. Extraído e adaptado de <<http://www.microscopy.ethz.ch/TEM-HRTEM.htm>>, em 14/10/2018.

Microscopia eletrônica de transmissão, além de operações no modo imagem, permite a operação no modo de difração de elétrons para obtenção de informação cristalográfica e também permite realizar espectroscopia, como por exemplo, a espectroscopia por fluorescência de Raios X, conhecida por EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*) que será explicada na seção 3.2.2.

3.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão e varredura - STEM

Para caracterizar nanopartículas bimetálicas e preparar amostras modelo, de tamanho e composição química controlados, é necessário o uso de uma ferramenta que permita investigar a composição química de nanopartículas individualmente, ou seja, é necessário o uso de uma ferramenta que possibilite acesso à informação química com resolução espacial. Para tanto, a ferramenta adequada para este trabalho, é o modo de transmissão e varredura conhecido por STEM (*Scanning Transmission Electron Microscopy*), onde um feixe convergente de elétrons forma uma sonda nanométrica que varre a amostra ponto a ponto. A sonda de elétrons pode interagir de diversas maneiras com este ponto da amostra, e assim pode gerar diferentes tipos de sinais, como elétrons espalhados elasticamente ou inelasticamente, luz visível, Raios X e etc. Esse sinal gerado é então utilizado para construir, pixel a pixel, uma imagem com a informação obtida, ponto a ponto, conforme mostrado na figura 25.

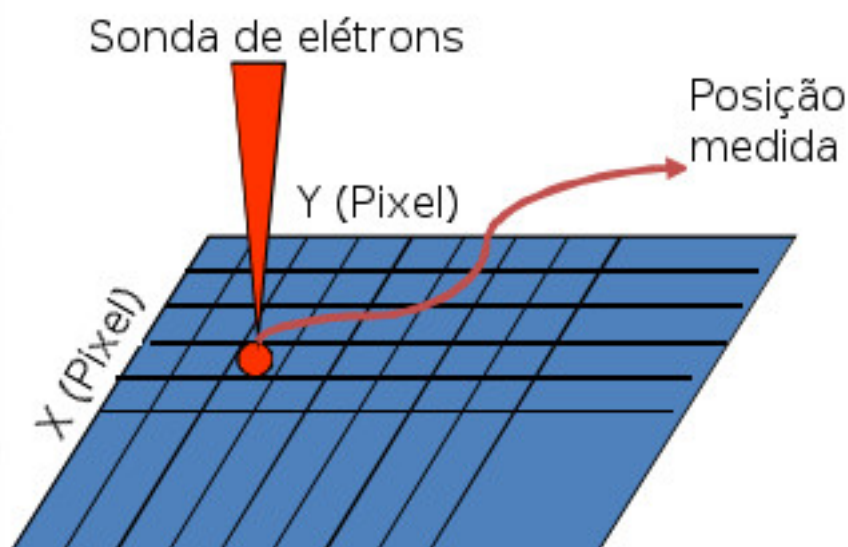


Figura 25 – Representação esquemática da aquisição de dados no modo STEM.

Sendo assim, é possível utilizar este modo de operação para diversos tipos de análise, como geração de imagens de campo claro (*Bright Field - BF*) e campo escuro (*Dark Field - DF*) e mapas elementais por EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*). A sonda de elétrons interage de diversas formas com a amostra e de acordo com essa interação, um tipo específico de informação pode ser adquirida e assim, como no modo TEM convencional,

no modo STEM os elétrons espalhados inelasticamente (elétrons que são espalhados pela nuvem eletrônica dos átomos da amostra) e o feixe direto, são utilizados para a formação de imagens de campo claro no modo STEM-BF, onde o contraste é dado pela redução de sinal do feixe na amostra. Na posição onde existe material, a intensidade medida é mais baixa que onde não existe, assim gerando um campo claro de fundo e tons mais escuros onde existe a amostra de interesse. Já as imagens de campo escuro, no modo STEM-ADF (*Annular Dark Field*), são formadas pelos elétrons espalhados elasticamente, ou seja, os elétrons espalhados pelo núcleo dos átomos da amostra de interesse. Esse feixe espalhado pelo núcleo segue o modelo de Rutherford e portanto, tem o ângulo em que os elétrons são transmitidos proporcionais ao número atômico. Quanto maior o número atômico, maior o espalhamento do elétron e portanto, utilizando um detector angular conforme ilustrado na figura 27, para detectar os elétrons espalhados elasticamente, pode ser formada uma imagem de campo escuro, onde o fundo é dado por sinal de baixa intensidade e a região da amostra terá sinal mais intenso que o fundo, variando o contraste em função do número atômico. A figura 26 mostra um exemplo de imagens de nanopartículas de ouro em campo claro e escuro geradas no modo de transmissão e varredura.

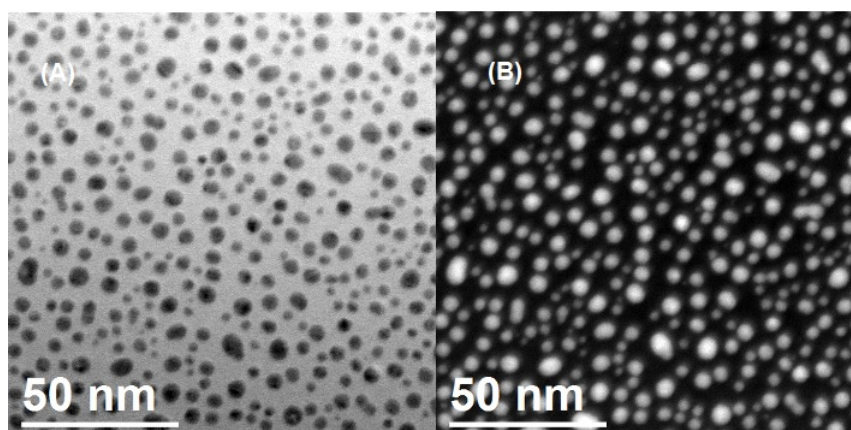


Figura 26 – Imagens de microscopia de transmissão no modo de varredura de nanopartículas de ouro geradas no equipamento JEM 2100F do LNNano a) Imagem de campo claro e b) Imagem de campo escuro.

Quando a região do detetor angular utilizada é de alto ângulo ($\theta > 50\text{mrad}$), se diz que o modo de operação é STEM-HAADF (*High Angle Annular Dark Field*). Nessa condição de detecção do feixe transmitido, ilustrada na figura 27, o sinal tende a ser menor, pois quanto maior o ângulo mais difícil ter elétrons espalhados para serem detetados. No entanto, devido ao fato de nesta condição a cristalografia não ser a principal responsável pela formação da imagem, e sim o espalhamento elástico dos elétrons, a possibilidade de ter variações de contraste em função do número atômico também é maior, o que permite ter informação de qual elemento está presente na região da amostra sendo sondada.

Nesse trabalho o modo STEM será utilizado conforme segue na figura 27, em que

uma sonda nanométrica de elétrons varre ponto a ponto a amostra e sinais de elétrons espalhados elasticamente serão coletados por um detector anular para gerar imagens STEM-ADF. Simultaneamente serão medidos os Raios X característicos da amostra, com informação composicional, que serão utilizados para gerar mapas elementais da amostra (STEM-EDS).

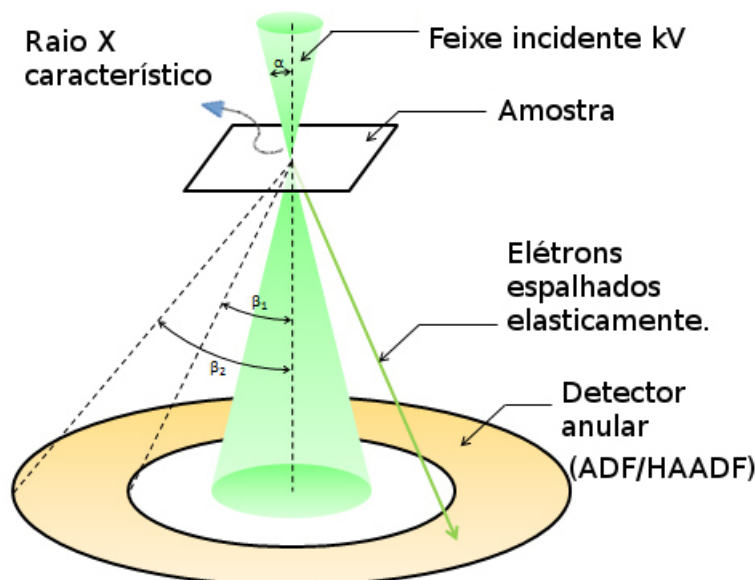


Figura 27 – Representação esquemática da interação da sonda de elétrons incidente com a amostra, gerando os sinais necessários para a aquisição de mapas elementais.

3.2.2 Espectroscopia por dispersão de energia - EDS

Espectroscopia por dispersão de energia ou EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*) é uma técnica de análise química, ou seja, é possível obter através dela informação composicional de uma amostra. Utilizando o feixe de elétrons tanto em modo TEM quanto em modo STEM, é possível obter fótons de Raios X característico dos elementos presentes na amostra. Os elétrons incidentes na amostra excitam elétrons de caroço para níveis mais altos de energia. As vacâncias geradas são então preenchidas por elétrons de níveis superiores e esses, ao mudarem de nível de energia, emitem a diferença de energia em forma de fótons cuja energia é característica do átomo excitado. Átomos de diferentes elementos possuem diferentes valores de energia para diferentes linhas de emissão. Linhas de emissão são as emissões de fótons geradas pela transição eletrônica de um estado mais energético para um estado menos energético. Quando ocorre uma transição da camada eletrônica L para a camada K por exemplo, tem-se a linha de emissão K_{α} , quando ocorre da camada M para a camada K tem-se a linha K_{β} , da camada M para a L tem-se a linha L_{α} e assim consecutivamente, conforme ilustrado na figura 28.

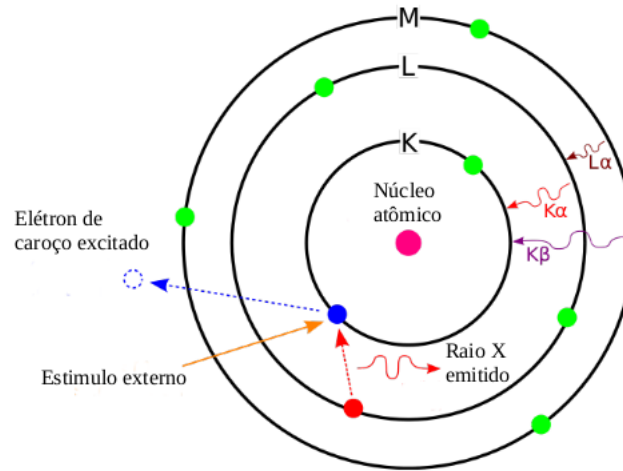


Figura 28 – Ilustração do fenômeno físico de emissão de fótons por excitações eletrônicas externas. Imagem extraída do site <http://www.wikiwand.com/en/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy>, em 22/06/2018

Os Raios X característicos emitidos pela amostra ao interagir com feixe de elétrons podem ser coletados e processados por um sistema de detecção localizado próximo ao porta-amostras.

A figura 29 ilustra o sistema de coleção, com o ângulo de coleção otimizado, fazendo com que fótons espúrios, oriundos da lente objetiva, não pertençam ao ângulo de coleção. Na figura 29 linhas tracejadas localizam os ângulos de coleção desejável e indesejável de detecção de fótons, de modo que o ângulo desejável possua apenas fótons provenientes da amostra. Em uma condição onde o espaço entre as peças polar superior e inferior é muito pequeno, o ângulo de coleção é prejudicado, implicando em uma pior relação sinal ruído da aquisição de dados.

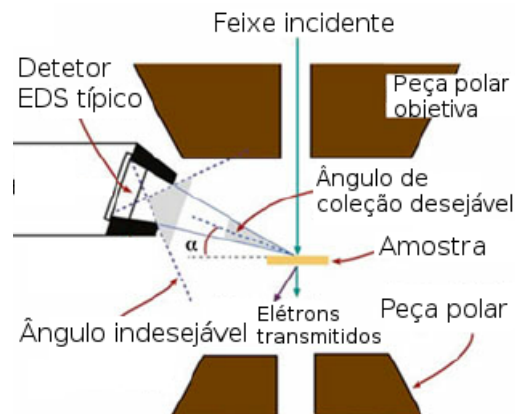


Figura 29 – Representação esquemática da disposição do detector de fótons de Raios X característico inserido na coluna do microscópio, próximo ao porta amostras localizado entre as peças polar da lente objetiva.

Como cada fóton emitido pela amostra possui uma energia característica, é possível a criação de um espectro de contagens de fótons em função da energia. Os sistemas de detecção convertem proporcionalmente a energia do fóton de Raios X em sinal elétrico, assim um detector conta o número de fótons emitidos em função de sua energia. O eixo da energia é separado em canais (pixels), então cada canal possui um tamanho em energia e nestes canais são contabilizadas as medidas de número de fótons de Raios X, gerando portanto um espectro de contagens de fótons em função da energia. Na figura 30, um conjunto de dados de Raios X característico de nanopartículas de AgAu é apresentado como exemplo típico de espectro gerado pelo sistema de aquisição. As linhas de emissão Cu, C são provenientes da grade de microscopia utilizada como substrato, Si do detetor, Au e Ag das nanopartículas e O dos nanopartículas e do substrato.

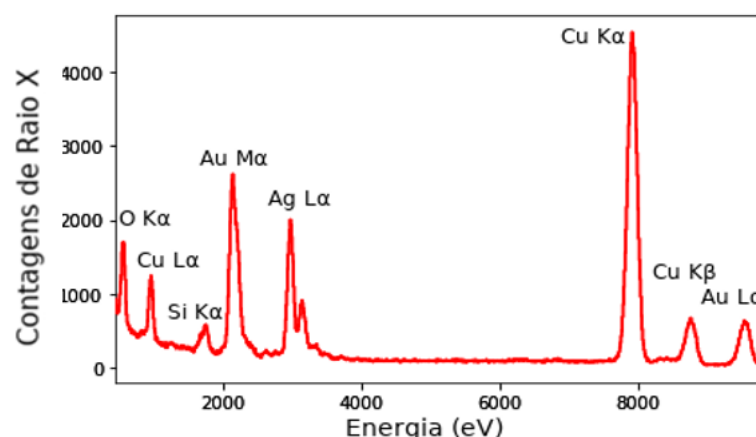


Figura 30 – Espectro EDS típico de nanopartículas de AgAu.

A desexcitação do átomo ionizado também pode ocorrer pela emissão de elétrons Auger, que são elétrons emitidos de camadas externas devido a interação com o fóton emitido na fluorescência, o que leva à uma concorrência entre fótons de Raios X característico e elétrons Auger. A desexcitação por elétrons Auger é preferencial para átomos de baixo número atômico Z enquanto fluorescência ocorre com maior frequência em átomos de elevado número atômico, essa relação do rendimento de fluorescência e do número atômico pode ser melhor compreendida na figura 31 onde o rendimento por vacância da fluorescência e do efeito Auger são comparados.

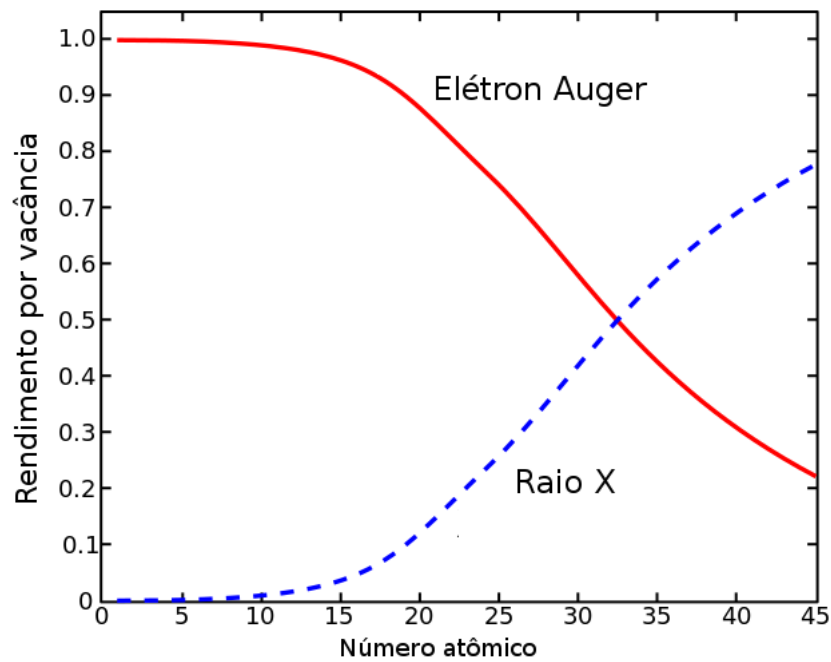


Figura 31 – Perfis de emissão devido a desexcitação de átomos ionizados em função do número atômico. Elétrons Auger em vermelho e Raios X característico em azul. Imagem extraída do site <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Auger_Yield.svg>, em 08/10/2018.

Devido à baixa probabilidade de se obter fótons de Raios X característico de amostras leves ($Z < 20$), o método de quantificação utilizando EDS possui maior precisão para elementos de maior número atômico ($Z > 20$). Portanto, para nanossistemas binários compostos de elementos de número atômico suficientemente grande, é viável utilizar EDS como um método quantitativo.

Em análises de espectroscopia em microscopia eletrônica, um parâmetro de importância para quantificação de composição química, é a fração de massa mínima ou MMF (Minimum Mass Fraction) que representa a menor concentração de um elemento, em porcentagem de massa (wt%), que pode ser medida pela técnica de caracterização. A MMF e a resolução espacial, são fortemente relacionadas, pois com o aumento da resolução espacial, o volume analisado pelo feixe de elétrons é menor e portanto, o sinal detectado terá menos contagens, ou seja, terá uma pior relação sinal ruído. Logo, para prover tanto resolução espacial quanto estatística relevante para incrementar a detecção mínima dos elementos, é de interesse um feixe de elétrons de corrente elétrica elevada e de alto brilho, que são características essenciais para análise química em microscopia eletrônica analítica. MMF pode ser estimada à partir da equação (3.8) (WILLIAMS et al., 2009) à seguir:

$$C_E(MMF) = \frac{3\sqrt{(2I_E^b)C_E}}{I_E - I_E^b} \quad (3.8)$$

onde I_E é o número de fótons de Raios X do pico característico, I_E^b é a contagem de fundo do pico e C_E é a composição química medida do elemento E.

Alternativamente, a fração de massa mínima também é interpretada como a massa mínima detectável ou MDM (Minimum Detectable Mass), definida como a menor quantidade de um elemento no material, dado em mg ou número de átomos.

A massa mínima detectável, além da quantidade de contagens, é dependente também da quantidade de material analisado, ou seja, depende do volume de interação do feixe com a amostra. Portanto, além de permitir maior resolução espacial, um feixe de elétrons pequeno mas com corrente suficiente, para que o sinal seja estatisticamente relevante, permite maior limite de detecção, por analisar um volume menor do material. A figura 32 ilustra a relação da resolução espacial com a MDM, onde os volumes de interação para três condições diferentes, são apresentados com seu respectivo limite de detecção.

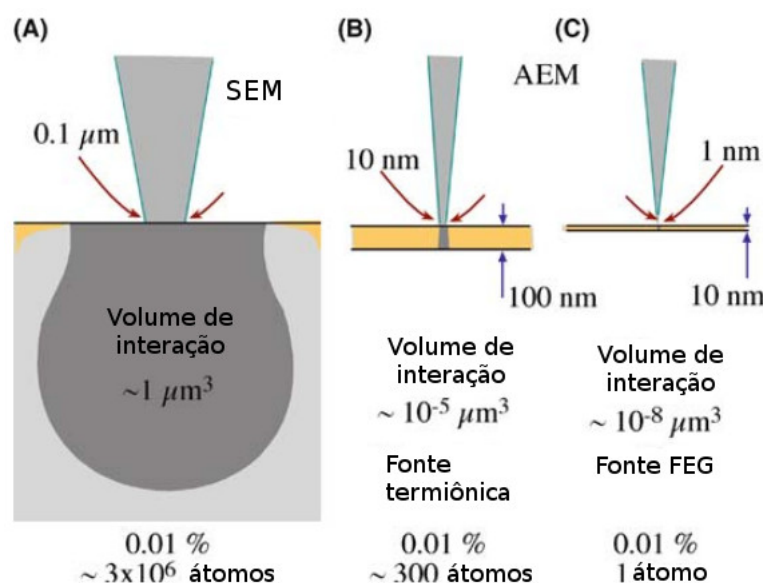


Figura 32 – Comparação do tamanho relativo do feixe e do volume de interação em A) Um microscópio eletrônico de varredura (*Scanning Electron Microscope - SEM*), um microscópio analítico (AEM) com B) fonte de elétrons termiônica e C) fonte por efeito de campo (*Field Emission Gun - FEG*) com amostras (*bulk*), fina e ultrafina respectivamente. A MMF (0.01%) corresponde a 10^{-7} átomos, 300 átomos e 1 átomos respectivamente (WILLIANS et al., 2009).

Logo, para a análise quantitativa de composição química de nanopartículas de alguns poucos nanômetros, proposta neste trabalho, é necessário o uso de uma sonda nanométrica com corrente suficiente para uma massa mínima detectável de alguns átomos, uma vez que, para efeito de ilustração do problema, uma partícula de 2 nm de AgAu possui aproximadamente 300 átomos.

A MMF é estimada, à partir do critério de que as contagens relativas à informação de interesse, devem ser superiores à pelo menos 3σ do ruído de fundo. No entanto, variados

critérios são propostos para a determinação do limite de quantificação de composição química. Assim, outros critérios de interesse para a determinação de um elemento e sua quantificação em uma análise elemental podem ser propostos. Um critério mais robusto do que o utilizado para a determinação da fração de massa mínima detectável, é o proposto por Currie (CURRIE, 1968), onde três limites específicos são definidos. O limite de decisão (L_C), de determinação (L_D) e de quantificação (L_Q).

O limite de decisão é definido pelo número de contagens necessárias para que se possa dizer que o sinal detectado é de fato sinal e não ruído de fundo, o limite de determinação é o valor de contagem necessário para que se possa assumir que um elemento específico foi detectado e o limite de quantificação é o número mínimo de contagens para que se possa quantificar o elemento analisado com uma determinada precisão. Para sinais com ruído de Poisson onde $\sigma = \sqrt{I}$, sendo I o número de contagens, Currie (CURRIE, 1968) estima os limites de detecção conforme ilustrado na figura 33, onde β é a porcentagem de falsos positivos e α é a porcentagem de falsos negativos da frequência relativa do sinal.

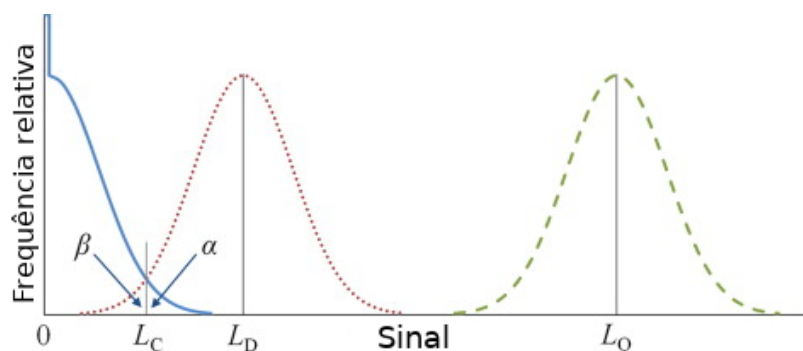


Figura 33 – Ilustração em distribuições normais dos limites de decisão, detecção e quantificação de sinais

Assumindo que apenas 5% da frequência relativa do sinal será de falsos positivos, ou seja $\beta = 5\%$, o valor do limite de decisão é dado por $L_C = 2.33\sqrt{I_b}$ onde I_b é o fundo do sinal analisado. Assumindo também, que a probabilidade de falsos negativos é dada por $\alpha = 5\%$, o limite de detecção então pode ser calculado como $L_D = 4.65\sqrt{I_b}$. Para estabelecer o limite de quantificação, além de considerar os falsos positivos e falsos negativos, deve-se considerar a precisão desejada, ou seja, o desvio padrão relativo da medida. Deste modo, Currie (CURRIE, 1968) propõe que para um desvio padrão relativo de 10%, o limite de quantificação deve ser $L_Q = 14.1\sqrt{I_b}$, indicando que para quantificação, deve-se obter bem mais contagens do que o necessário para análises qualitativas dos espectros de Raio X característico, conforme ilustrado pela figura 33. Ainda que o critério de quantificação seja proposto desta maneira por Currie (CURRIE, 1968), o real limite de quantificação de uma medida é estabelecido pela informação que se deseja medir, ou seja, pelo valor de composição química que se deseja quantificar, e pela precisão necessária para se distinguir a medida do ruído, podendo ser necessário um desvio padrão relativo menor

que os 10% propostos, fazendo com que assim, seja necessário obter mais contagens do que o estabelecido pelo critério de Currie (CURRIE, 1968).

3.2.3 Mapeamento elemental e dados hiperspectrais

Quando uma sonda convergente é utilizada no modo de varredura, ou seja, no modo STEM, o feixe de elétrons irá passar por cada ponto da amostra de interesse e gerar fótons de localizações específicas, conforme ilustrado anteriormente pela figura 27. Isso permite que seja criada uma imagem, onde as intensidades dos pixels são as contagens de Raios X característico. Os fótons emitidos pela interação do feixe com a amostra, são detectados por um detector próximo da amostra. Este detector possui canais de detecção, ou seja, ele armazena contagens em uma unidade mínima de detecção tipicamente de 1024 a 4096 canais. Estes canais, podem ser calibrados para que cada unidade mínima corresponda à uma quantidade, no caso, unidades de energia, tipicamente algumas unidades de eV. O que gera então, um espectro em energia com histogramas de contagens de fótons de Raios X característico das linhas de emissão do material analisado, como ilustrado anteriormente pela figura ??.

Desse modo, um conjunto de dados tridimensional é adquirido, onde para cada coordenada espacial tem-se um espectro EDS como ilustrado pela figura 34. Esse conjunto de dados, é conhecido por mapeamento elemental e é denominado como um cubo de dados ou conjunto de dados hiperspectrais.

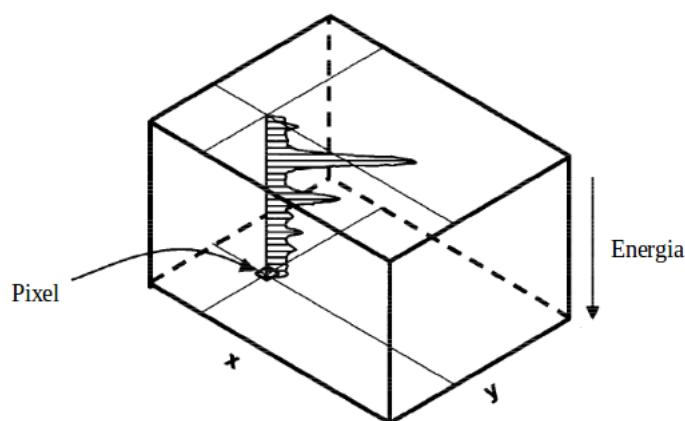


Figura 34 – Ilustração de um cubo de dados de STEM-EDS onde as coordenadas espaciais são dadas por (x,y) e a coordenada espectral é dada por energia (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003).

Através desse dado hiperspectral, é possível obter informações sobre a composição química da amostra com resolução espacial, como mostrado pela figura 35, de modo a com-

plementar outras técnicas de microscopia como STEM-HAADF para identificação de fases pelo contraste químico e HRTEM para identificação de planos cristalinos. Caracterizando assim, a morfologia, a composição química e a estrutura cristalina dos nanossistemas.

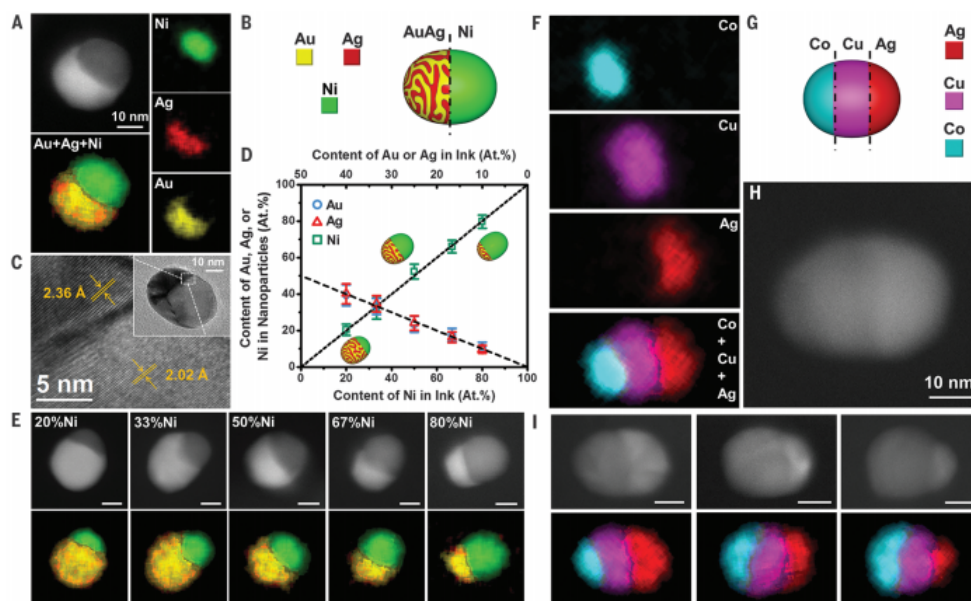


Figura 35 – STEM-HAADF, HRTEM e mapeamento elemental de nanopartículas metálicas com diferentes composições químicas. A) Identificação de fase por STEM-HAADF e análise elemental por STEM-EDS de NP de AuAgNi; B) Modelo para visualização da morfologia da NP de AuAgNi; C) HRTEM da NP de AgAuNi com medida aproximada dos planos cristalinos; D) Mapa de fase da NP de AuAgNi; E) STEM-HAADF e STEM-EDS de NP's de AgAuNi variando a porcentagem de níquel; F) Mapas elementais STEM-EDS de NP de CoCuAg; G) Modelo para visualização da morfologia da NP de CoCuAg; H) STEM-HAADF CoCuAg e I) STEM-HAADF e STEM-EDS de NP's de CoCuAg variando a composição química (CHEN et al., 2016).

Na condição de sonda convergente a resolução espacial do mapa elemental é dada por uma relação entre o tamanho da sonda e o quanto os elétrons se espalham ao atravessar a amostra, sendo assim, idealmente a resolução de uma imagem espectral será tão boa quanto menor for a sonda de elétrons utilizada. No entanto, ao utilizar sondas muito pequenas (0.5 nm - 0.7 nm) dependendo da corrente do feixe, o sinal de EDS pode ser muito baixo para se obter qualquer informação, seja qualitativa ou quantitativa. Por isso, tipicamente, sondas maiores do que 1 nm são utilizadas nesse tipo de experimento.

Para a aquisição de dados de STEM-EDS foi utilizado o equipamento JEM 2100F, microscópio eletrônico de transmissão de alto brilho, com um canhão de elétrons do tipo FEG (*Field Emission Gun*) e com detetor SDD (*Silicon Drift Detector*) para EDS do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LNNano.

As amostras que foram estudadas nesse projeto, por STEM-EDS, são nanopartículas

de AgAu depositadas em grades de microscopia de cobre com substrato de filme fino de carbono cuja espessura nominal é 3 nm. Para quantificar a porcentagem de átomos de cada elemento, mapas elementais foram gerados por uma varredura com sonda de 1 nm de valor nominal, tempo de exposição ao feixe por pixel de 150 ms - 200 ms e tamanho de pixel de 0.47 nm. O tamanho da sonda de 1 nm foi determinado para se obter a melhor relação possível entre sinal e resolução espacial que o microscópio utilizado pode proporcionar. O tempo de exposição foi escolhido de modo a se obter o máximo de sinal com o mínimo de dano às nanopartículas e o tamanho do pixel é determinado pelo tamanho da sonda utilizada, pois de acordo com o teorema de Nyquist para amostragens em digitalização de informação, para que haja otimização da digitalização o tamanho do pixel deve ser tal que seja no mínimo 70% do tamanho da sonda.

Como a estrutura do dados de STEM-EDS é de manipulação complexa, por se tratar de uma matriz tridimensional, a comunidade de microscopia eletrônica tem buscado soluções que permitam a análise destes conjuntos de dados com maior facilidade. Uma opção para analisar essa estrutura de dados hiperspectrais é o pacote HyperSpy (De La Peña et al., 2017) da plataforma de programação python, que é a ferramenta escolhida para este trabalho pois permite não somente a manipulação destes dados, mas também o processamento com funções pré-implementadas de análise estatística de dados, *machine learning* e processamento de imagens. Trabalhos em microscopia eletrônica e análise hiperspectral já vem sendo realizados utilizando HyperSpy (BURDET; CROXALL; MIDGLEY, 2015), (ROSSOUW et al., 2015) e (YANKOVICH et al., 2016) o que revela o potencial desta ferramenta gratuita para análise de dados hiperspectrais.

3.2.4 Quantificação da composição química pelo método de Cliff-Lorimer

Utilizando o espectro de EDS é possível quantificar a quantidade de cada elemento presente no material. Para isso alguns cuidados devem ser tomados e para cada tipo de amostra um tipo diferente de método deve ser utilizado. Para condições em que a amostra é fina (menor que 10 nm), a absorção de fótons pelo próprio material é mínima, e para um sistema binário com elementos A e B a quantificação da composição química pode ser obtida pelo método de Cliff-Lorimer (CLIFF; LORIMER, 1975). Esse método relaciona as intensidades de fótons de Raios X característicos com a razão das composições, como segue na equação (3.9)

$$\frac{C_A}{C_B} = K_{AB} \frac{I_A}{I_B} \quad (3.9)$$

em que C_A e C_B são as composições dos elementos A e B, K_{AB} é uma constante a ser determinada e I_A e I_B as constagens de fótons de Raios X dos elementos A e B.

A constante K_{AB} é uma constante que pode ser calculada através da expressão

(3.13), que é determinada à partir do fato da intensidade de fótons emitidos ser proporcional à uma probabilidade de ionização do átomo, dada pela seção de choque de ionização Q . Ser proporcional também, à chance de emissão de fótons, ao ionizar um átomo, dada pelo rendimento de fluorescência w , que é um parâmetro definido como a probabilidade de desexcitação de um átomo excitado através da emissão de um fóton. E também depende da chance de se emitir uma determinada linha do espectro de Raios X característico, determinada pela probabilidade de transição a associada à essa linha de emissão.

Todos esses parâmetros, associados a probabilidade de emissão de um fóton de Raios X característico, são levados em consideração junto da eficiência do detector ϵ que de maneira diretamente proporcional, contribuem para a formação do sinal à ser adquirido, resultando na seguinte expressão de intensidade de fótons para um elemento A dada pela equação (3.10) (LORIMER, 1987):

$$I_A = \frac{C_A Q_A \omega_A a_A \epsilon_A t}{A_A} \quad (3.10)$$

onde A_A é a massa atômica do elemento A e t a espessura do material.

Devido à relação das contagens de fótons com os parâmetros citados acima, a constante K_{AB} pode ser derivada em função destes parâmetros:

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{C_A Q_A \omega_A a_A \epsilon_A A_B}{C_B Q_B \omega_B a_B \epsilon_B A_A} \quad (3.11)$$

$$\frac{C_A}{C_B} = \frac{(Q\omega a\epsilon)_B A_A}{(Q\omega a\epsilon)_A A_B} \frac{I_A}{I_B} \quad (3.12)$$

e portanto,

$$K_{AB} = \frac{(Q\omega a\epsilon)_B A_A}{(Q\omega a\epsilon)_A A_B} \quad (3.13)$$

Como todos os parâmetros de (3.13) são propriedades dependentes da amostra à ser analisada e do instrumento de medida, ao invés de calcular e determinar cada um destes parâmetros que é um procedimento muito impreciso, a constante K_{AB} pode ser determinada através de uma calibração utilizando uma amostra similar, de composição química conhecida, como referência.

Para a determinação das composições de um sistema binário, se faz necessário a determinação da constante de calibração da equação (3.9). Para isso é utilizada uma amostra referência de composição previamente conhecida e com os mesmos elementos a serem investigados na amostra de interesse. Como neste projeto as amostras a serem investigadas são nanopartículas de AgAu entre 3 nm - 9 nm, uma amostra de filme fino de AgAu foi preparada pelo Laboratório de Microfabricação do LNNano. O filme fino foi

depositado sobre substratos de silício para quantificação por fluorescência de Raios X e também foi depositado sobre grades de microscopia para análise por EDS. A deposição foi feita pelo método de evaporação *e-beam* onde um feixe de elétrons incide sobre um pedaço macroscópico de metal, no caso ouro e prata, e este metal é evaporado com seus átomos sendo depositados no substrato de interesse. Conhecendo a taxa de remoção de átomos e controlando o tempo de deposição é possível controlar a espessura do filme depositado. No preparo dessa amostra foi utilizada uma microbalança de quartzo que permite a determinação de quanto material foi depositado, assim tornando possível estimar a espessura e a composição do filme fino, sendo estes valores de 8nm para a espessura e 50/50% para a composição em átomos. Nesta síntese foram depositados dois filmes mudando as ordens dos elementos depositados sobre o silício, ou seja, um filme de ouro sobre prata e outro filme de prata sobre ouro como representado esquematicamente na figura 36. Para garantir homogeneidade, as amostras foram depositadas em uma base giratória.

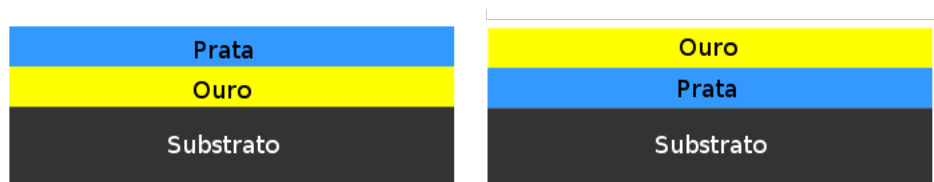


Figura 36 – Representação esquemática do filme fino de AgAu depositado para calibração do método de quantificação composicional.

Na aquisição dos dados para calibração, utilizou-se no microscópio uma abertura condensadora maior que o usual, permitindo obter uma sonda grande e com maior intensidade, o que proporciona um maior número de contagens em detrimento da resolução espacial. O tamanho estimado da sonda para a situação foi de 2.7 nm o que implica em um tamanho de pixel estimado em 1.9 nm. Para a realização do mapeamento do filme fino de AgAu foi utilizado um tempo por pixel de 100 ms e o mapa elemental foi construído com 64x64 pixels, e deste conjunto de dados foi possível derivar valor da constante de calibração K_{AB} .

3.2.5 Dano por radiação e controle de dose.

Uma das principais desvantagens da microscopia eletrônica de transmissão é o fato da técnica interagir muito com o material analisado, ou seja, o feixe de elétrons causa danos às amostras e em muitas situações as amostras podem ser modificadas, implicando em resultados que não necessariamente corresponderiam ao material em seu estado original, antes da incidência do feixe de elétrons. Alguns dos principais mecanismos de dano devido a exposição ao feixe de elétrons são: aquecimento, radiólise e pulverização (EGERTON; LI; MALAC, 2004).

Para nanopartículas metálicas, o efeito preponderante é a remoção de átomos por pulverização por *knock on*, devido ao fato de átomos superficiais serem mais facilmente removíveis (EGERTON et al., 2010). Além disso, diferentes elementos são removidos a diferentes taxas, o que pode gerar consideráveis mudanças na composição final após a medida das nanopartículas. Os elétrons transferem momento para os átomos do material devido ao espalhamento elástico, que à partir de uma energia de *threshold* de algumas centenas de KeV são removidos do sólido. Essa energia varia com o número atômico dos elementos e para o caso de materiais *bulk*, quanto maior o número atômico, maior a energia necessária para remover os átomos (EGERTON; LI; MALAC, 2004).

Como nanopartículas são sistemas diminutos, a remoção de átomos por pulverização, pode variar a sua composição química drasticamente. Esse efeito é demonstrado por Braidly (BRAIDY et al., 2008) com nanopartículas de AgAu de 6.7, 8.5 e 13.7 nm e de diferentes composições químicas analisadas por EDS utilizando uma sonda elétrons convergente, estática e com diâmetro maior que o das partículas, da ordem de 20 nm. Ao supor que apenas um dos átomos deixará o sistema, devido ao deslocamento por *knock on*, é possível modelar a variação da composição em função da exposição ao feixe. De acordo com Braidly, a razão das composições de Ag e Au após um determinado tempo de exposição ao feixe é escrita em termos da razão das composições iniciais e das contagens dos átomos do elemento remanescente. No caso deste modelo, o elemento que irá variar, implicando na alteração da composição química relativa, será a prata. Os átomos de ouro permanecerão no sistema. O modelo então propõe a seguinte relação entre a composição química inicial e final:

$$\frac{C_{Ag}}{C_{Au}} = \frac{C_{Ag}^0}{C_{Au}^0} e^{-R \cdot I_{Au}} \quad (3.14)$$

onde C_x é a composição química ao fim da medida, C_x^0 é a composição inicial, I_{Au} é a contagem de fótons de Raios X característico de Au e R é uma constante proporcional a seção de choque de deslocamento dos átomos de Ag.

Linearizando a equação (3.14) tem-se que:

$$\ln \frac{C_{Ag}}{C_{Au}} = \ln \frac{C_{Ag}^0}{C_{Au}^0} - R \cdot I_{Au} \quad (3.15)$$

Assim, através de um gráfico semilog da razão das composições e das contagens de Au é possível avaliar o perfil da variação de composição devido à pulverização, conforme segue na figura 37.

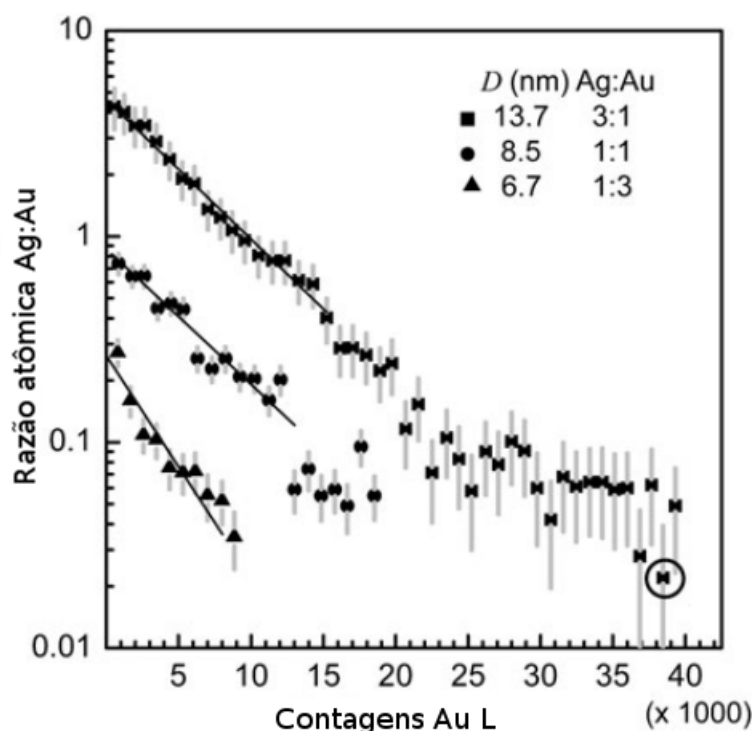


Figura 37 – Gráfico semilog da evolução razão das composições de Ag e Au em função da contagem de Au acumulada no tempo (BRAIDY et al., 2008).

No gráfico da figura 37 a região linear é a região utilizada para estimar a variação da composição química das NP's, a região não linear onde tem um ponto circulado, como exemplo, é a região abaixo da fração de massa mínima detectável pela técnica de caracterização utilizada.

Sabendo que, para quantificar a composição química das nanopartículas individuais, é necessário maximizar o número de constagens e minimizar o dano causado às nanopartículas, parâmetros de aquisição foram exaustivamente otimizados em uma energia fixa de 200 kV para o feixe de elétrons. A aquisição dos dados deste trabalho ocorreu portanto, conforme os parâmetros expostos pela tabela 1.

Sonda	Mapa (Pixels)	Exposição/pixel	Frames	Exposição total
1 nm	64 × 64	20 ms	10	200 ms

Tabela 1 – Parâmetros utilizados na aquisição de dados de mapas elementais por STEM-EDS.

A escolha de realizar a medida com mais *frames*, se deve ao fato do dano ser reduzido em aquisições de múltiplas varreduras mais rápidas ao invés de uma única varredura mais lenta (JONES et al., 2018). Nessa situação, ao receber momento, os átomos tem a possibilidade de relaxar de um estado meta-estável e voltar a se estabilizar na nanopartícula, reduzindo assim o efeito de variação composicional durante a quantificação.

3.3 Análise de componentes principais - PCA

Análise de componentes principais ou PCA (Principal Component Analysis) é um método estatístico que se baseia na reconstrução de um determinado conjunto de dados em uma base ortogonal composta por componentes principais, que são as componentes que melhor representam o conjunto de dados. Desse modo, é possível reduzir sua dimensionalidade, conservando a informação útil e reduzindo o ruído. O método foi proposto inicialmente por Pearson (F.R.S., 1901) e Hotelling (HOTELLING, 1933) e hoje é utilizado para análise e tratamento de enormes conjuntos de dados, ou como são usualmente chamados, *big data*. PCA tem sido amplamente aplicado nos mais diversos campos de estudo, como processamento de imagens (ZHANG et al., 2010), neurociência (CAPRIHAN; PEARLSON; CALHOUN, 2008) e agricultura de precisão (BRAUNGER et al., 2017). No presente estudo o método será utilizado como um redutor de dimensionalidade visando a redução de ruído de dados hiperspectrais gerados por STEM-EDS (PARISH; BREWER, 2010).

O método PCA busca uma nova base onde o conjunto de dados possa ser reconstruído, ou seja, busca reescrever o conjunto de dados original em um combinação linear de vetores que melhor represente a informação de interesse contida nos dados. Os critérios estabelecidos para a busca dessa nova base são: A maximização da variância, minimização da redundância e ortogonalidade da base gerada, ou seja, o método busca que seja calculado um primeiro vetor diretor, da direção de maior variância do conjunto de dados, depois é calculado um segundo vetor diretor, da segunda direção de maior variância, tal que este seja ortogonal ao primeiro e assim consecutivamente.

Deste modo, seja \mathbf{X} e \mathbf{Y} matrizes $m \times n$ relacionadas por uma transformação linear \mathbf{P} onde \mathbf{X} representa o conjunto de dados original e \mathbf{Y} este mesmo conjunto de dados em uma nova base.

$$\mathbf{PX} = \mathbf{Y} \quad (3.16)$$

O PCA tem como objetivo eliminar ou pelo menos, reduzir a informação redundante em \mathbf{Y} . Então, o que se busca é que uma variável co-varie pouco com outra variável. Deste modo a matriz covariância de \mathbf{Y} , \mathbf{S}_y , deve ser otimizada para que tenha covariâncias minimizadas e variâncias maximizadas, ou seja, uma matriz covariância otimizada é uma matriz diagonal, uma vez que os termos não diagonais são covariâncias e os termos diagonais são variâncias. A matriz covariância de \mathbf{Y} é dada por:

$$\mathbf{S}_y = \frac{1}{n-1} \mathbf{Y}\mathbf{Y}^T \quad (3.17)$$

Sendo assim, tem-se que:

$$\frac{1}{n-1} \mathbf{Y} \mathbf{Y}^T = \frac{1}{n-1} (\mathbf{P} \mathbf{X})(\mathbf{P} \mathbf{X})^T = \frac{1}{n-1} \mathbf{P} \mathbf{X} \mathbf{X}^T \mathbf{P}^T \quad (3.18)$$

$$\mathbf{S} \mathbf{y} = \frac{1}{n-1} \mathbf{P} \mathbf{A} \mathbf{P}^T \quad (3.19)$$

Onde $\mathbf{A} = \mathbf{X} \mathbf{X}^T$

Sabendo que uma matriz \mathbf{A} simétrica é diagonalizável por uma matriz de seus autovetores ortonormais, tem-se que existe \mathbf{U} tal que $\mathbf{A} = \mathbf{U} \mathbf{D} \mathbf{U}^T$ onde \mathbf{D} é uma matriz diagonal e \mathbf{U} é uma matriz onde as colunas são autovetores de \mathbf{A} . Seleccionando \mathbf{P} tal que os vetores linhas \mathbf{p}_i , das i -ésimas linhas de \mathbf{P} , sejam autovetores de \mathbf{A} , tem-se que $\mathbf{P} = \mathbf{U}^T$.

$$\frac{1}{n-1} \mathbf{P} \mathbf{A} \mathbf{P}^T = \frac{1}{n-1} \mathbf{P} \mathbf{P}^T \mathbf{D} \mathbf{P} \mathbf{P}^T \quad (3.20)$$

Como a matriz inversa de uma matriz ortogonal é sua matriz transposta, tem-se que $\mathbf{P}^{-1} = \mathbf{P}^T$. Então,

$$\mathbf{S} \mathbf{y} = \frac{1}{n-1} \mathbf{P} \mathbf{P}^{-1} \mathbf{D} \mathbf{P} \mathbf{P}^{-1} \quad (3.21)$$

$$\mathbf{S} \mathbf{y} = \frac{1}{n-1} \mathbf{D} \quad (3.22)$$

Portanto, PCA explora a escolha de uma base de autovetores ortogonais baseado na maximização da variância e na minimização da redundância, de modo que as componentes principais de \mathbf{X} sejam autovetores de $\mathbf{X} \mathbf{X}^T$, sendo estes, as linhas de \mathbf{P} e as variâncias associadas a estas componentes principais, sejam os autovalores das componentes principais. Sendo assim, cada componente é associada à uma variância e quanto maior essa variância, mais representativa para o conjunto de dados é a componente. Esta descrição pode ser encontrada com mais detalhes em (SHLENS, 2003).

3.3.1 Uso de PCA na redução de ruído em dados hiperspectrais gerados por espectroscopia STEM-EDS

O objetivo do uso de PCA em dados hiperspectrais de STEM-EDS é decompor os dados originais em compomenentes principais que melhor os represente. Estas componentes, podem ser utilizadas para reconstruir o conjunto de dados original, de modo que seja obtida a informação relevante e o ruído da imagem espectral seja reduzido. O método PCA também pode ser aplicado junto de outros métodos de *machine learning*, como

ICA (*Independent Component Analysis*) e NMF (*Non-negative Matrix Factorization*), que são úteis para extração de sinais e, no caso de mapas elementais, separação de fases em componentes da imagem espectral, com respectiva quantificação composicional destas diferentes fases (ROSSOUW et al., 2015) e (JANY; JANAS; KROK, 2017).

No caso de sinais de EDS, a emissão dos fótons de Raios X característico segue uma distribuição poissoniana. Sendo assim, as intensidades dos espectros possuem uma incerteza relacionada ao número de contagens N , que para um desvio padrão é dada por \sqrt{N} , esta incerteza se sobressai com relação às demais incertezas na aquisição dos dados e assim, para um baixo número de contagens, a relação sinal ruído será pequena. As maneiras de se melhorar a relação sinal ruído são adquirir mais contagens ou reduzir o ruído. Mais contagens podem ser alcançadas com um longo tempo de exposição da amostra de interesse ao feixe e redução de ruído pode ser feito aplicando análise de componentes principais (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003) e (PARISH; BREWER, 2010).

Uma imagem espectral, tipicamente terá milhares de espectros e cada espectro, milhares de canais de energia. Toda essa informação, pode ser melhor representada em uma nova base com espectros que contenham toda a informação relevante dos dados originais, agindo como um redutor de dimensionalidade. A relação entre o conjunto de dados hiperespectral original com as componentes principais, é ilustrado na figura 38, onde um conjunto de dados hiperespectral hipotético, de um material cerâmico com três fases distintas, é utilizado para ilustrar a decomposição em componentes que representem as informações composicionais contidas nos dados, nestas condições idealmente o método decompõe o mapa elemental em uma componente principal por fase.

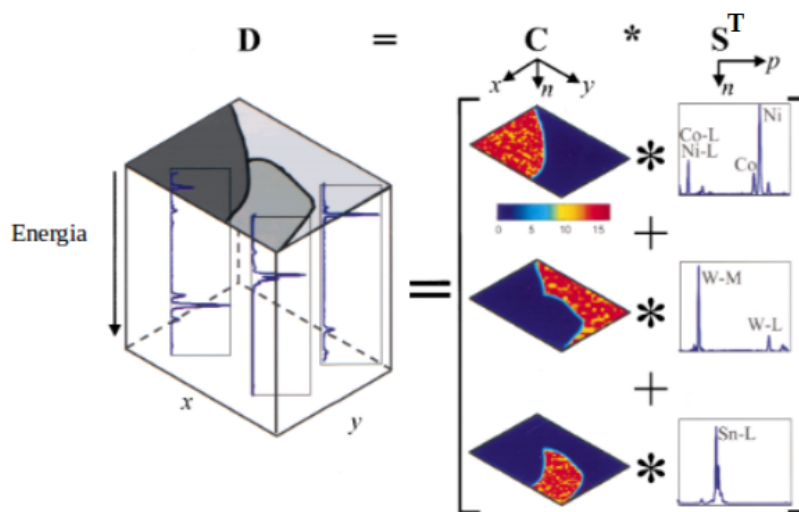


Figura 38 – Relação entre o cubo de dados e as componentes principais para um caso hipotético onde n é número de componentes determinado pela análise, x e y as coordenadas espaciais e p o número de canais de energia por espectro (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003).

Como as contagens seguem estatística de Poisson, é natural que cada elemento do conjunto de dados possua um nível de ruído diferente, pois cada elemento possui uma contagem diferente. Logo o PCA padrão irá ponderar mais a favor na escolha dos altos níveis de ruído nas componentes principais enquanto os menores níveis ficarão em outras componentes. Para minimizar este problema, antes de processar os dados com PCA é feita uma normalização poissoniana, que transforma o conjunto de dados com diferentes níveis de ruídos em um conjunto de ruído normalizado (KEENAN; KOTULA, 2004). Este procedimento estabiliza a variância do ruído de Poisson e isso não modifica o conjunto de dados original, mas busca a homogeneização do ruído para que todos pesem o mais igualmente possível na análise de componentes principais.

Neste trabalho então, após realizada a estabilização do ruído de Poisson, é feito o filtro de ruído por PCA, que utiliza a diagonalização da matriz covariância do conjunto de dados, para obter autovetores que compõe essa nova base e assim, conforme ilustrado na figura 38, o conjunto de dados representando pela matriz \mathbf{D} , pode ser reconstruído como uma combinação linear das componentes principais representadas pela matriz \mathbf{S}^T , que são os autovetores cujas variâncias possuem maior valor. A combinação linear para reconstrução da imagem espectral, na base das componentes principais, pode ser escrita como na equação (3.23),

$$D_i = C_{(i,1)}S_1 + C_{(i,2)}S_2 + \dots + C_{(i,n)}S_n + P_i \quad (3.23)$$

onde D_i é o i ésimo espectro da imagem espectral, os termos $C_{(i,n)}$ são os pesos das componentes principais S_n e P_i é o ruído a ser eliminado pela análise de componentes principais, sendo este majoritariamente ruído de Poisson.

Deste modo, na figura 38 o conjunto de dados original representado por \mathbf{D} , é escrito como a multiplicação de duas matrizes \mathbf{C} e \mathbf{S}^T , onde o número de componentes principais representado é dado por $n = 3$, sendo que cada componente principal representa uma fase do conjunto de dados hipotético.

Na figura 39, é possível verificar o efeito do uso do PCA como redutor de ruído, em dados de EDS adquiridos por um microscópio eletrônico, permitindo definir melhor a família de linhas de emissão Sn-L, de um espectro pertencente à um único pixel da imagem espectral. Em azul, conjunto de dados antes do tratamento por PCA e em preto o mesmo conjunto de dados reconstruído com menos ruído.

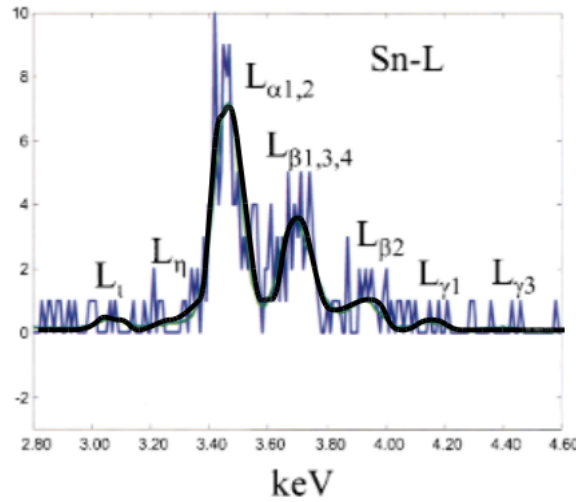


Figura 39 – Comparação de espectros de um único pixel, em azul espectro original e em preto o espectro após aplicação de PCA. (KOTULA; KEENAN; MICHAEL, 2003)

Neste projeto, a técnica de redução de ruído de imagens espectrais apresentada, será utilizada em dados de STEM-EDS de nanopartículas bimetálicas de AgAu, de modo a se reduzir a incerteza da quantificação dos elementos presentes no sistema.

A reconstrução dos dados com menor ruído é feito segundo o número de componentes principais. Essas são escolhidas de acordo com a variância associada a essas componentes. Assim, a proporção das variâncias são analisadas de modo a se escolher o número de componentes, sendo essa proporção a medida da contribuição de cada variância na representação dos dados como, expõe a equação (3.24) onde λ_i é variância da i -ésima componente e λ_j a variável do somatório que compreende todas as p variâncias que representam o conjunto de dados.

$$\frac{\lambda_i}{\sum_{j=1}^p \lambda_j} \quad (3.24)$$

A proporção das variâncias pode ser graficada para facilitar a escolha do número de componentes principais conforme segue na figura 40

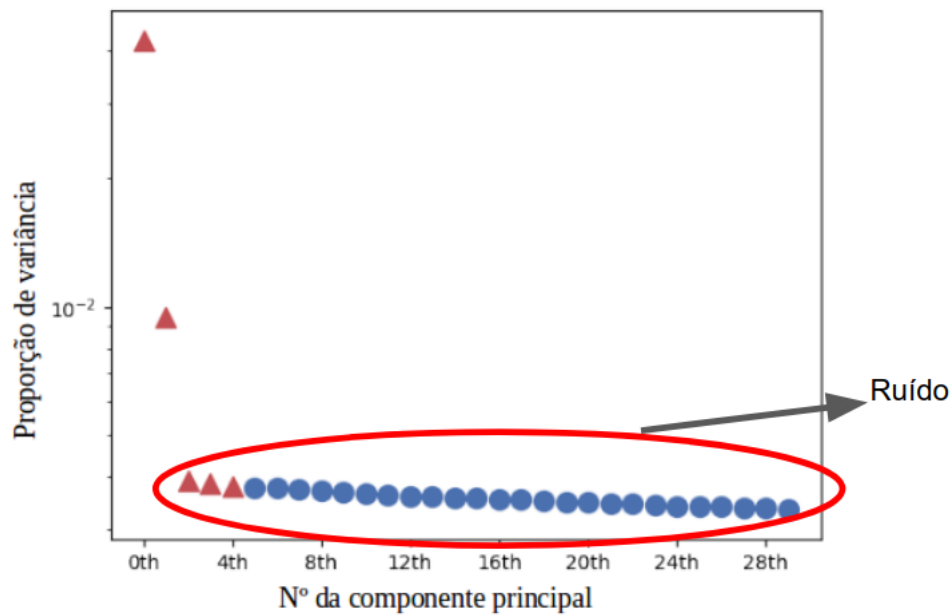


Figura 40 – Gráfico da proporção das variâncias das componentes geradas pelo PCA aplicado nos dados de STEM-EDS do filme fino de AgAu, as variâncias em vermelho representam as variâncias a serem utilizadas na reconstrução do conjunto de dados e as azuis o resíduo a ser descartado como ruído poissoniano.

Ainda pode haver informação correspondente à amostra nas componentes da ordem do ruído e portanto, é recomendável a escolha de algumas componentes a mais do que as componentes que mais se sobressaem no gráfico. Sendo assim para o exemplo da figura 40 foram escolhidas 5 componentes quando apenas 2 de fato se sobressaem com relação às outras.

Conforme explicado anteriormente, antes de aplicar PCA no conjunto de dados, deve ser feita a estabilização da variância devido à natureza da distribuição de Poisson. Caso este procedimento não seja realizado em conjuntos de dados de STEM-EDS, o critério de decisão de quantas componentes principais existem na reconstrução dos dados na nova base não pode mais ser utilizado, uma vez que o PCA não consegue mais separar adequadamente as variâncias correspondentes ao ruído e ao sinal, conforme pode ser visualizado na figura 41, onde são comparadas as proporções de variâncias na decomposição em componentes principais, para um conjunto de dados sem a variância normalizada e o mesmo conjunto com normalização da variância.

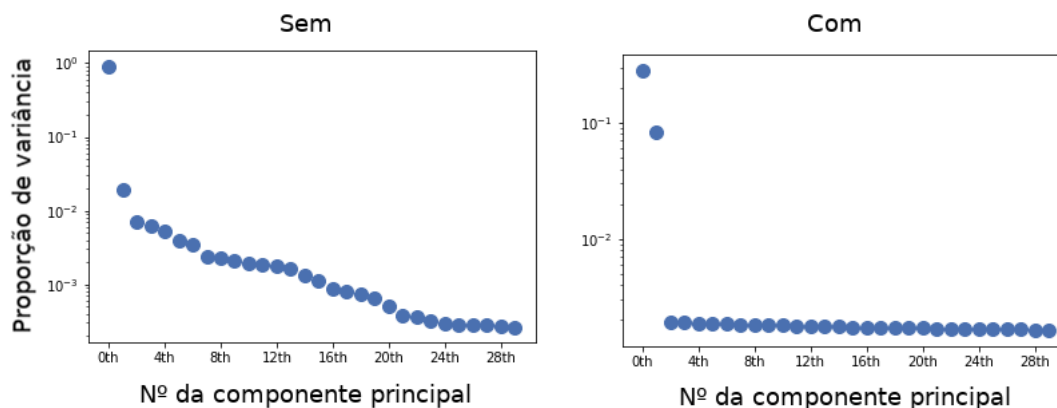


Figura 41 – Gráficos da proporção de variância das componentes principais. À esquerda sem estabilização da variância e à direita com a estabilização.

A figura 42 ilustra a metodologia estabelecida neste trabalho para a quantificação composicional e individual de nanopartículas bimetálicas.

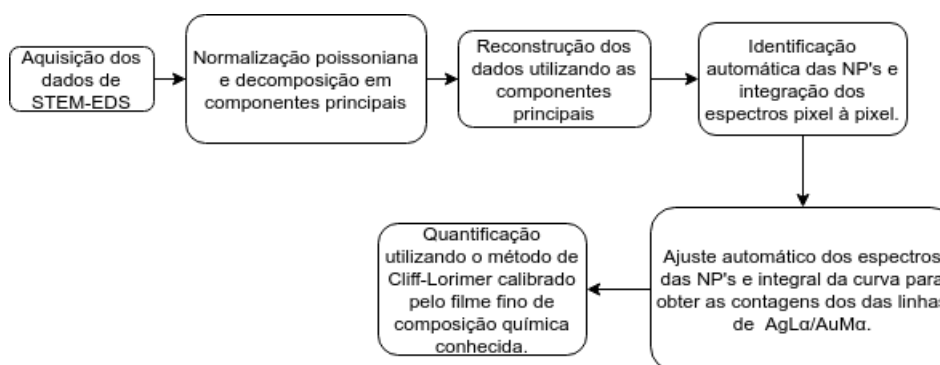


Figura 42 – Fluxograma do procedimento a ser utilizado na aplicação de análise de componentes principais em dados de STEM-EDS para a quantificação de nanopartículas bimetálicas.

3.3.2 Limitações do uso de PCA em dados hiperspectrais

Como ilustrado anteriormente, PCA é uma poderosa técnica de redução de ruído em conjuntos de dados hiperspectrais. No entanto, cuidados devem ser tomados ao filtrar os dados com PCA. Em condições limites de baixa relação sinal ruído, informação fisicamente significativa para a reconstrução do conjunto de dados nas componentes principais, pode ser ignorada devido à sua variância ser da mesma ordem da variância do ruído e isso pode induzir à artefatos nos dados filtrados (CUEVA et al., 2012; LICHTERT; VERBEECK, 2013).

A relação sinal ruído é determinada por vários parâmetros como brilho do feixe de elétrons, tempo de exposição ao feixe em cada pixel (*dwell time*) e ângulo de coleção do detector. Dependendo da sensibilidade da amostra ao feixe e do sistema de aquisição de dados, estes parâmetros, mesmo que otimizados, podem estar no limite da técnica de

caracterização, impossibilitando atingir uma relação sinal ruído ótima para a decomposição de um número suficiente de componentes principais para reconstruir o conjunto de dados sem induzir artefatos. Ao negligenciar componentes de pequena variância mas fisicamente significante, um erro sistemático (*bias*) pode ser associado ao conjunto de dados filtrado, prejudicando a análise de dados. Conforme (SPIEGELBERG; RUSZ, 2017), esse erro será caracterizado pelo número de componentes principais, número de canais em energia, número de pixels e erro estatístico. Sendo assim esses parâmetros devem ser otimizados. Quanto menor o erro estatístico e quanto maior os números de canais em energia e pixels, menor será o seu efeito. Além disso, como fonte de *bias*, erros estatísticos do ruído existente nos dados induzem erros em cada componente gerada como base da reconstrução dos dados. A figura 43 ilustra dados hiperspectrais simulados para mostrar esse efeito (SPIEGELBERG; RUSZ, 2017). Na simulação publicada por Spiegelberg foram utilizados dois conjuntos de dados hiperspectrais, o primeiro com um número reduzido de pixels e o segundo com um número 2^{11} vezes maior de pixels, mas mantendo o mesmo número de canais em energia. Nesses dados simulados foi adicionado o mesmo nível de ruído gaussiano e o método PCA foi empregado para avaliar a decomposição do conjunto de dados em componentes principais.

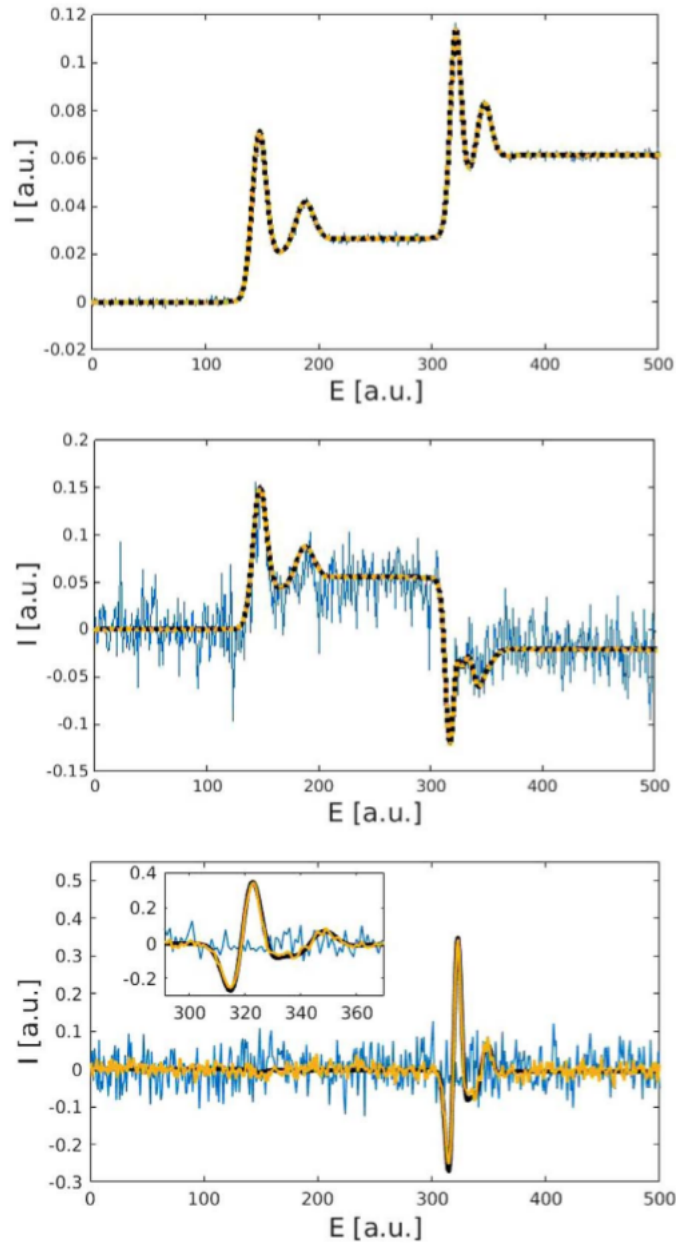


Figura 43 – Dados reconstruídos com as três primeiras componentes principais (de cima para baixo) de dados hiperspectrais simulados. Em preto com menos pixels e sem ruído, em azul com menos pixels e com ruído e em amarelo com mais pixels e com ruído (SPIEGELBERG; RUSZ, 2017).

É possível observar na figura 43 que para as duas primeiras componentes as três condições simuladas coincidem, embora a segunda componente mostre uma componente mais ruidosa para a condição com menos pixels (em azul). Enquanto na terceira componente para a condição com menos pixels, o sinal desaparece quando comparado à curva do conjunto de dados sem ruído (em preto), o que gera um erro na reconstrução dos dados e um *bias*. Já para o conjunto de dados com ruído mas com muito mais pixels (em amarelo), é verificada uma maior aproximação das duas condições na terceira componente, ilustrando a redução desse efeito.

4 Resultados

4.1 Efeito do PCA na quantificação da composição química de nanopartículas bimetálicas - Simulação de dados hyperspectrais

Para estudar o efeito de redução de ruído em dados hyperspectrais gerados por STEM-EDS, nós simulamos dados correspondentes à análise de nanopartículas bimetálicas de AgAu de 4.3 nm dispersas em uma imagem espectral de tamanho $64 \times 64 \times 2000$ voxels, com os pixels e canais de energia calibrados para 0.47 nm de tamanho de pixel e 5 eV por canal. Para construir esse conjunto de dados, espectros foram gerados com gaussianas colocadas em série com larguras à meia altura de 100 - 150 eV e com picos associados à linhas de emissão dos mesmos elementos presentes nos dados adquiridos experimentalmente, a figura 44 mostra os espectros simulados. Os parâmetros considerados nessa simulação são compatíveis com os parâmetros dos dados adquiridos experimentalmente nesse trabalho e que serão apresentados nas próximas seções.

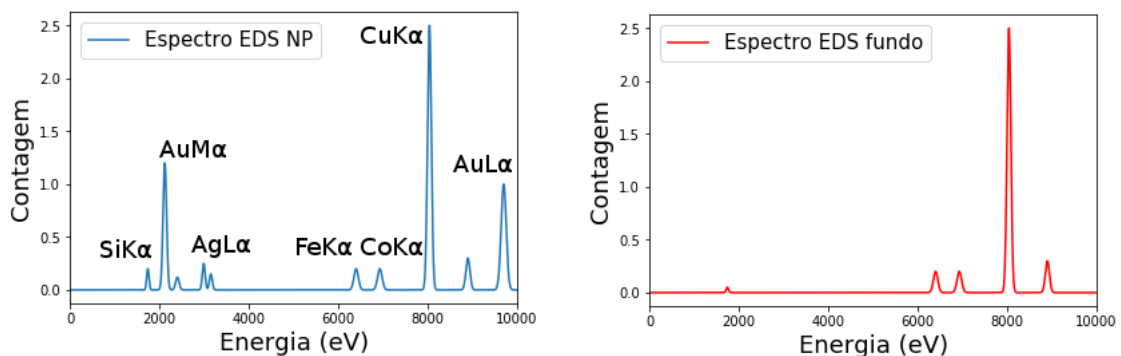


Figura 44 – Espectros simulados para a construção da imagem espectral, em azul espectro para associar a pixels que formam as partículas e em vermelho espectro que forma o fundo.

Assim, utilizando o pacote HyperSpy (De La Peña et al., 2017), cubos de dados vazios foram gerados e preenchidos pixel a pixel pelos espectros simulados. Em posições estipuladas para às nanopartículas, espectros com linhas de emissão de Ag, Au e linhas de fundo foram inseridas e para posições estipuladas para serem o fundo, apenas linhas pertencentes a Si do detector, Cu da grade de microscopia e Fe/Co da lente objetiva do microscópio. As proporções das intensidades dos picos em cada espectro foram todas feitas tomando como referência dados experimentais obtidos neste trabalho. Posteriormente, ruído poissoniano foi aplicado aos conjuntos de dados, permitindo comparações de análise de dados ruidosos e dados livres de ruído. Na figura 45 é mostrado o cubo de dados

simulado para nanopartículas de uma mesma composição química de 75% de Au em porcentagem de átomos.

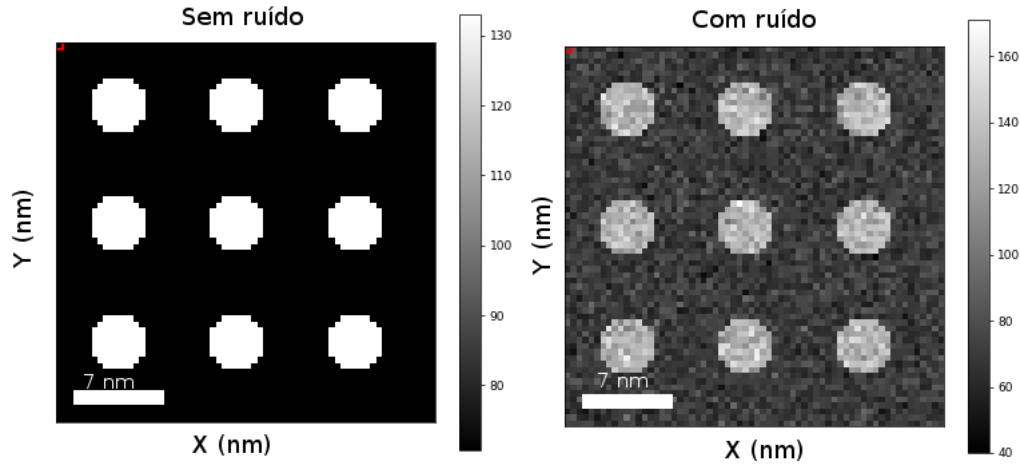


Figura 45 – Cubo de dados simulado para nanopartículas de mesmos tamanho e composição química. Na esquerda, imagem espectral livre de ruído e na direita com ruído.

A figura 46 mostra proporção das variâncias das componentes principais obtidas pela aplicação do PCA nos dados da figura 45. Nela é possível notar como o ruído modifica o resultado obtido para a decomposição dos dados.

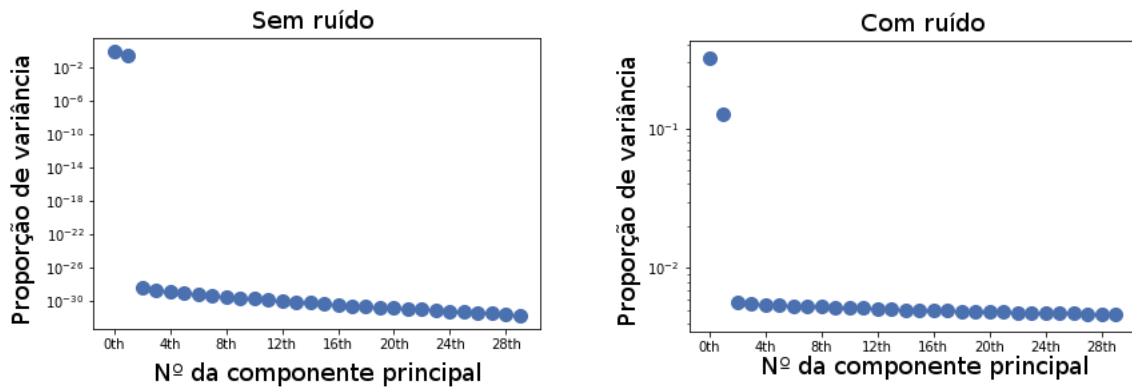


Figura 46 – Proporção de variância da decomposição em componentes utilizando PCA no conjunto de dados simulado. Na esquerda conjunto de dados livre de ruído e na direita conjunto de dados aplicado ruído poissoniano.

Para verificar o efeito da quantificação composicional das nanopartículas de diferentes composições, foram então simuladas duas diferentes populações com diferentes composições químicas, de 75% e 65% de Au em porcentagem de átomos, uma em cada cubo de dados. Então, os dois cubos de dados foram unidos, formando um único cubo de dados de tamanho $64 \times 128 \times 2000$ voxels. Na figura 47 é ilustrada uma imagem espectral simulada com e sem ruído poissoniano.

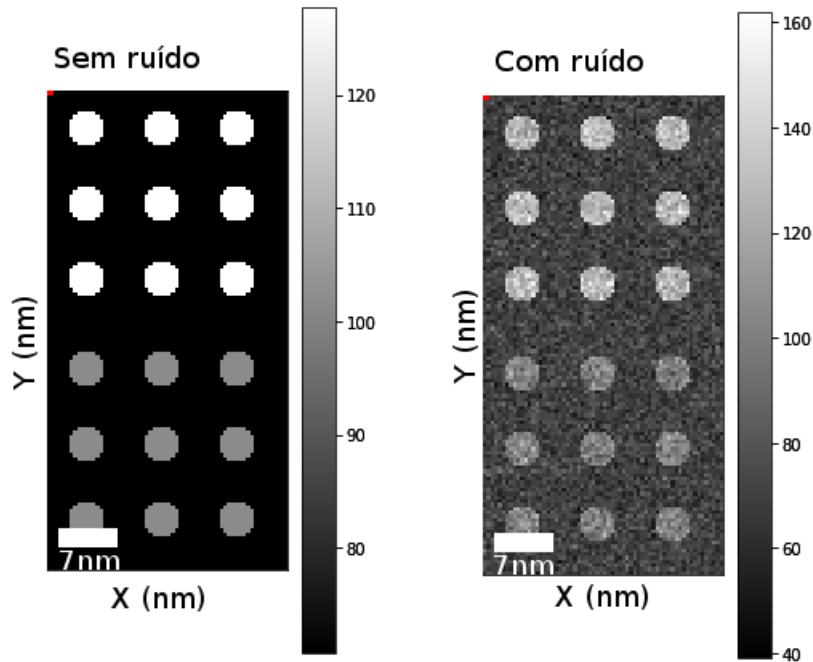


Figura 47 – Cubo de dados simulado com duas populações composicionais diferentes. Na esquerda, imagem espectral livre de ruído e na direita com ruído.

Na figura 48, é possível verificar o peso das variâncias associadas às componentes principais do PCA aplicado aos dados da figura 47. Comparando essas proporções de variância, com a condição de partículas idênticas da figura 46, onde surgem apenas duas variâncias preponderantes, é possível verificar que para partículas com composição química variando em dois valores distintos, no mesmo cubo de dados, surge uma terceira componente principal. Essa terceira componente principal, possui o peso de sua variância visível na condição sem ruído poissoniano da figura 48, mas na situação com ruído poissoniano aplicado, essa variância se aproxima bastante à variância das componentes associadas ao ruído, indicando que informação relevante para a reconstrução dos dados, se mistura ao ruído e portanto, nesta situação, o método pode não conseguir distinguir o que é informação física de baixa variância e o que é ruído, ao reconstruir os dados, filtrando ambos.

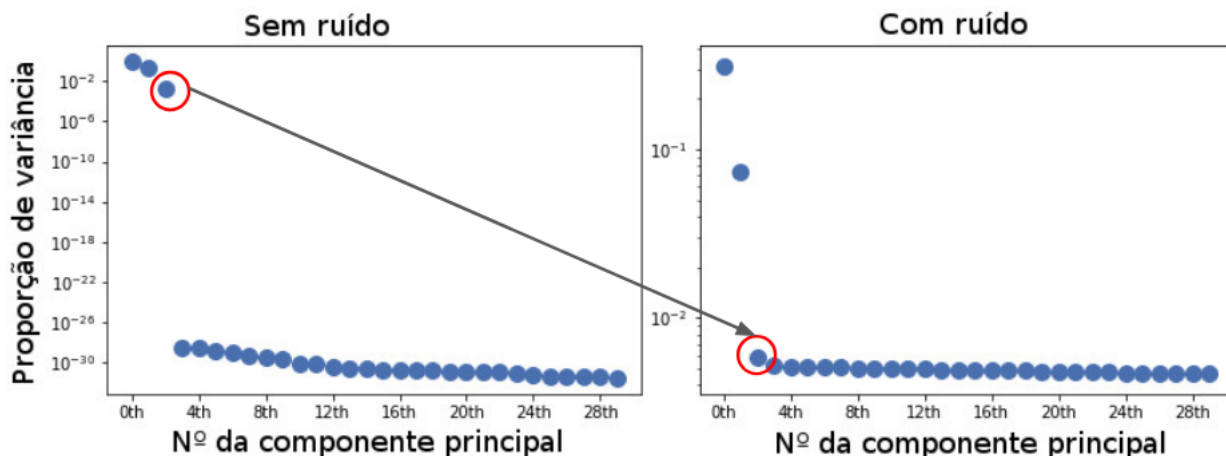


Figura 48 – Proporção de variância da decomposição em componentes utilizando PCA no conjunto de dados simulado com duas populações de nanopartículas. Na esquerda conjunto de dados livre de ruído e na direita conjunto de dados aplicado ruído poissoniano.

Utilizando estes dados, nas condições sem ruído e sem filtro por PCA (**Bruto**), sem ruído mas com filtro por PCA (**PCA**), com ruído e não filtrado (**Bruto+Ruído**) e com ruído e filtrado (**PCA+Ruído**), foi aplicado o procedimento de quantificação composicional proposto neste trabalho e mostrado pelo fluxograma da figura 42. Como a precisão e acurácia da quantificação é majoritariamente definida pelo ruído poissoniano, ao variar o número de contagens é possível, nos gráficos da figura 49, observar o efeito da aplicação do PCA na quantificação da composição química das nanopartículas. Assim, podemos estimar e melhor interpretar os resultados obtidos experimentalmente.

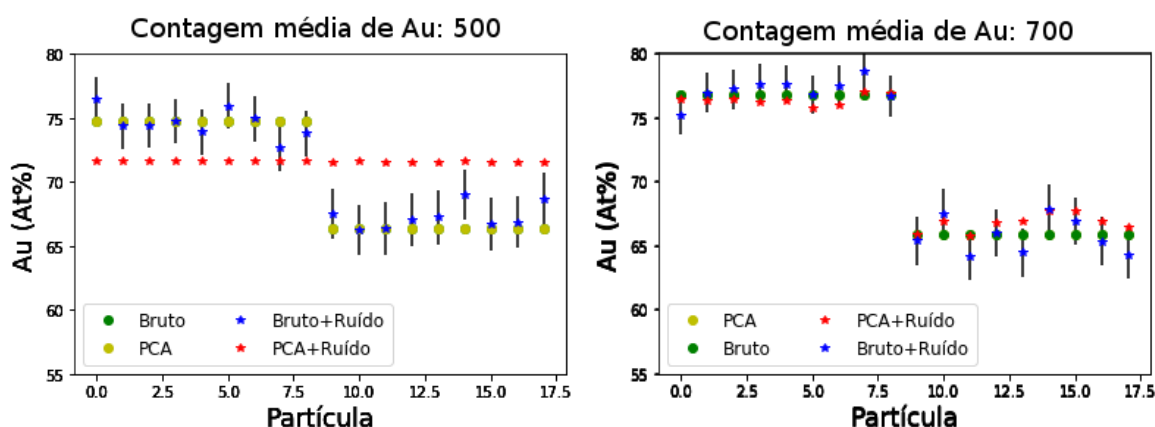


Figura 49 – Composição química em porcentagem de átomos de Au. Na esquerda conjunto de dados com menos contagens e na direita com mais contagens. Em verde simulação sem ruído e sem filtro por PCA (**Bruto**), em amarelo sem ruído mas com filtro por PCA, em azul bruto e com ruído e em vermelho com ruído e com filtro por PCA.

Cada ponto na figura 49 representa a composição química obtida de uma nano-

partícula simulada para duas contagens de Au: 500 e 700. Pontos amarelos e verdes se sobrepõem nas duas condições simuladas com menos contagens e com mais contagens, o que indica que na ausência de ruído o método de fato não modifica em nada o conjunto de dados original ao reconstruí-lo, levando à uma mesma quantificação de composição química.

Já para a condição de quantificação dos dados com ruído e sem PCA (em azul) é determinada uma distribuição de composições ao redor do valor da composição real das nanopartículas, que seria no caso, a composição das nanopartículas dos dados sem ruído. Todos os valores para os dados brutos e com ruído, dentro de sua barra de erro, coincidem com o valor da composição química esperada. Os dados ruidosos e filtrados por PCA (em vermelho) no entanto, apresentam um comportamento diferente para as duas condições. Na situação de menos contagens, os valores da composições obtidas convergem para um valor intermediário, uma média, dos valores de composição das duas populações de nanopartículas, o que significa que a informação de variação de composição química entre as duas populações desapareceu junto do ruído, induzindo um artefato na quantificação da composição química. Ao aumentar as contagens dos dados simulados, o artefato desaparece e os valores se aproximam dos valores da composição sem ruído. Isto se deve ao fato de o PCA induzir um *bias* quando informação física pertinente é negligenciada na reconstrução dos dados, conforme já mostrado na literatura por Cueva (CUEVA et al., 2012), Lichtert (LICHTERT; VERBEECK, 2013) e Spiegelberg (SPIEGELBERG; RUSZ, 2017) e também explicado na seção 3.3.2 onde é tratado das limitações do uso de PCA como redutor de ruído em dados hiperspectrais.

4.2 Determinação da constante de calibração K_{AgAu} para quantificação composicional.

O método escolhido para a quantificação composicional das nanopartículas bi-metálicas de AgAu é o Cliff-Lorimer (CLIFF; LORIMER, 1975), devido à sua relativa simplicidade e por ser um método adequado para amostras finas, menores que 10 nm de espessura, onde os efeitos de absorção dos fótons de Raios X característico são mínimos.

Conforme explicado na seção 3.2.4, o método avalia a razão das contagens de fótons de Raios X característicos da amostra, com relação à sua composição relativa. Para o sistema binário AgAu, a equação (3.9) é escrita como:

$$\frac{C_{Ag}}{C_{Au}} = K_{AgAu} \frac{I_{Ag}}{I_{Au}} \quad (4.1)$$

Para determinar a constante de calibração K_{AgAu} na equação (4.1), um filme fino de AgAu, explicado na seção 3.2.4, foi usado como amostra de referência. Na figura

50, um mapa elemental do filme fino é apresentado com seu espectro EDS da região selecionada com picos das linhas de emissão, utilizados na quantificação da composição química das nanopartículas de AgAu. Para identificar o número de contagens do mapa elemental adquirido por STEM-EDS, visível na figura 50, os espectros de cada pixel são somados, gerando um espectro de contagens de fótons de Raios X característico de toda a região varrida pelo feixe. Selecionando-se a região de interesse em que estão as contagens, correspondentes às transições AgL_{α} em torno de 2990 eV e AuM_{α} em torno de 2120 eV, é possível realizar o ajuste da curva conforme pode ser visto na figura 50 e à partir deste ajuste é possível integrar a curva, obtendo-se os valores de fótons correspondentes às transições eletrônicas de cada elemento.

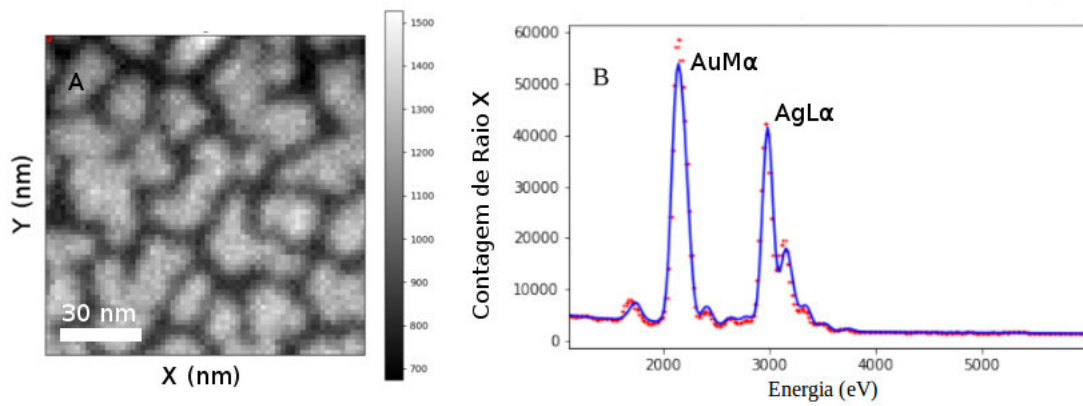


Figura 50 – STEM-EDS de filme fino de AgAu. A) Mapa elemental gerado com todas as contagens de tudo que foi medido pela amostra e B) Espectro total do mapa elemental com ajuste da curva feito sobre a região de interesse onde estão localizadas as emissões AgL_{α} e AuM_{α} .

A constante de calibração K_{AB} usualmente é calibrada para a porcentagem de massa, mas neste projeto as composições apresentadas das nanopartículas são em porcentagem de átomos, então a constante de calibração será sempre apresentada em porcentagem de átomos. Sendo assim, as composições calculadas através do métodos de Cliff-Lorimer serão em porcentagem de massa e posteriormente convertidas em porcentagem de átomos. Assim, o valor determinado para a constante de calibração foi $K_{AgAu} = 1.07 \pm 0.01$, onde para a determinação da incerteza foram utilizadas apenas as contagens de fótons adquiridos.

Um quantificação independente da amostra de referência deve ser feita com o propósito de confirmar sua já conhecida composição química, para evitar possíveis equívocos. Para isso, amostras do filme fino de AgAu foram preparadas para quantificação por fluorescência de Raios X. Essa medida, no entanto, ainda não foi concretizada.

4.3 Danos nas nanopartículas e efeitos na quantificação composicional.

Para sistemas sensíveis ao feixe de elétrons, são necessários cuidados para não danificar a amostra ou, de algum modo, modificá-la. Assim, para a análise das nanopartículas de AgAu deste trabalho, uma análise similar ao trabalho de Braidy (BRAIDY et al., 2008) foi feita. Foi utilizada uma sonda de 1 nm varrendo em múltiplos *frames* uma nanopartícula de 5 nm por um longo tempo de exposição (30 minutos) e acumulando em intervalos de tempos as contagens de fótons de Raios X. Deste modo, foi verificada a variação da composição química da partícula ao longo do tempo, de modo a ser também possível verificar um perfil decrescente na composição química avaliando um gráfico semilog da razão das composições em função das contagens de AuM α , conforme segue na figura 51.

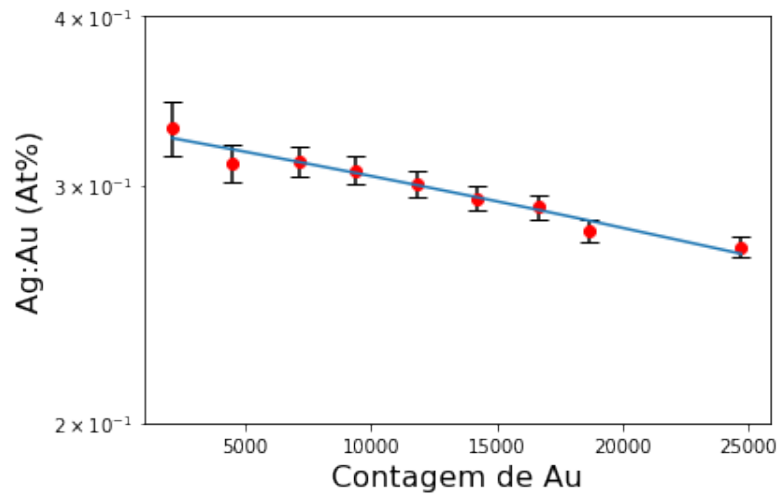


Figura 51 – Gráfico semilog da evolução da razão das composições de Ag e Au em função da contagem de AuM α acumulada no tempo.

Utilizando os ajustes da região linear do gráfico da figura 37, os valores de R determinados são aproximadamente de $R = 20.10^{-6}$ contagens $^{-1}$, enquanto para o ajuste da figura 51 foi possível estimar através do coeficiente angular um valor de $R = 8.10^{-6}$ contagens $^{-1}$, garantindo assim a confiabilidade das medidas de composição química com relação a variação de composição química por remoção de átomos *knock on*.

À partir da verificação da existência de variação da composição química das nanopartículas devido a exposição ao feixe de elétrons, é possível estimar um tempo de aquisição seguro para as análises quantitativas de nanopartículas de AgAu.

Os dados neste trabalho foram adquiridos para obter o maior número de contagens com efeito destrutivo mínimo sobre as amostras. Utilizando o ajuste linear da figura 51 e assumindo o modelo de Braidy (BRAIDY et al., 2008) é estimado que a composição das nanopartículas variou menos de 1%.

4.4 Quantificação semi-automatizada da composição de diferentes sínteses de nanopartículas de AgAu.

Nanopartículas de AgAu foram produzidas pela fonte de nanopartículas descrita anteriormente. Três amostras com alvos de diferentes composições foram preparadas em grades de microscopia para análise em um microscópio eletrônico de transmissão. A síntese é de tamanho controlado através do uso de um espectrômetro de massa por tempo de voo. Para uma síntese com a pulverização de um alvo metálico com um fio de ouro e um fio de prata, ou seja, 1:1 fios de ouro e prata, foi feita uma distribuição de tamanho das nanopartículas para comparar com o resultado obtido pelo espectrômetro de massa ilustrado na figura 52, onde a curva correspondente ao espectrômetro de massa, está cortada em 3,8 nm devido a limitações do sistema de aquisição utilizado.

Para a verificação do controle composicional de nanopartículas de AgAu foram fabricadas três diferentes amostras com três diferentes composições de alvos metálicos compostos por fios trançados entre si, uma com um fio de ouro e um fio de prata (1:1), outra com um fio de ouro e dois fios de prata (1:2) e outra com um fio de ouro e três de prata (1:3).

As nanopartículas foram depositadas com uma concentração tal que a distribuição espacial depositadas no carbono da grade de microscopia fosse suficiente para analisar um bom número de nanopartículas no mesmo mapa elemental e também tal que as partículas não ficassem demasiado próximas e comesçassem a coalescer, formando nanopartículas maiores e que não são representativas para a verificação do controle da síntese. Um exemplar dos mapas adquiridos pode ser visto na figura 53, com os pixels com intensidade dada pelas contagens de fótons das linhas AgL_α e AuM_α . À esquerda os dados brutos antes da redução de ruído por PCA e à direita os dados pós PCA. Para a reconstrução dos dados por PCA foram selecionadas 5 componentes principais, sendo a proporção das variâncias correspondentes a estas componentes destacadas em vermelho na figura 54. O tamanho da sonda utilizada para as aquisições de nanopartículas de AgAu foi de 1 nm com 150 ms-200 ms de tempo de exposição por pixel sendo 64×64 pixels com 0,47 nm de tamanho. Com o objetivo de tentar reduzir o dano às partículas, o tempo de exposição total foi dividido em múltiplas varreduras para assim os átomos terem tempo, entre uma varredura e outra, de voltar à uma condição estável e portanto, não ser removido da nanopartícula.

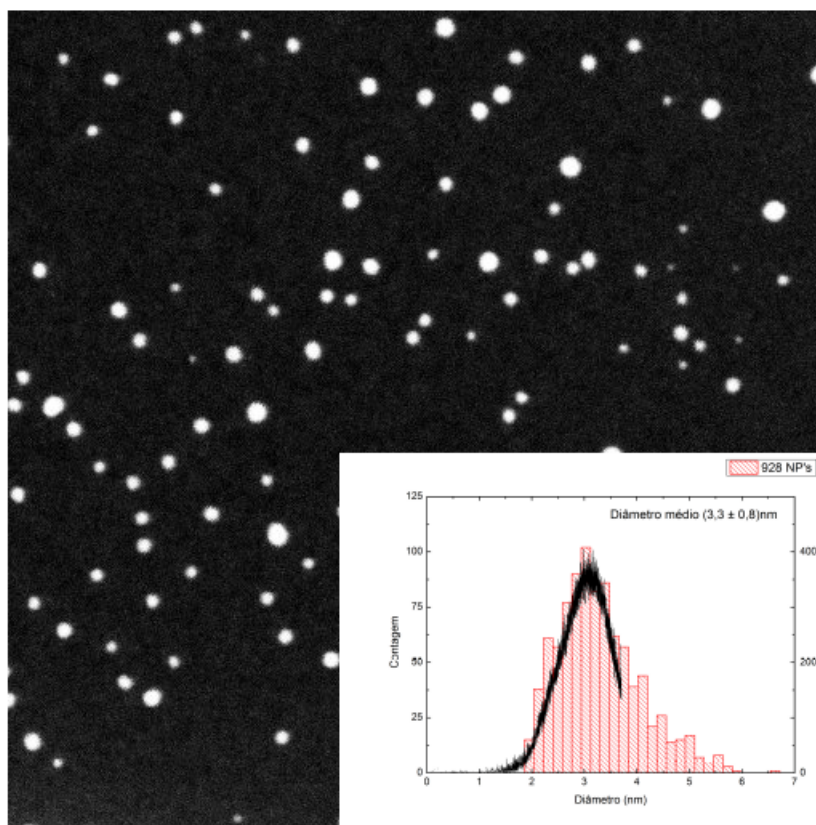


Figura 52 – Comparação da distribuição de tamanhos da deposição de nanopartículas de AgAu. Curva em preto corresponde ao espectro adquirido pelo TOF e em vermelho corresponde a 928 nanopartículas medidas por STEM-DF.

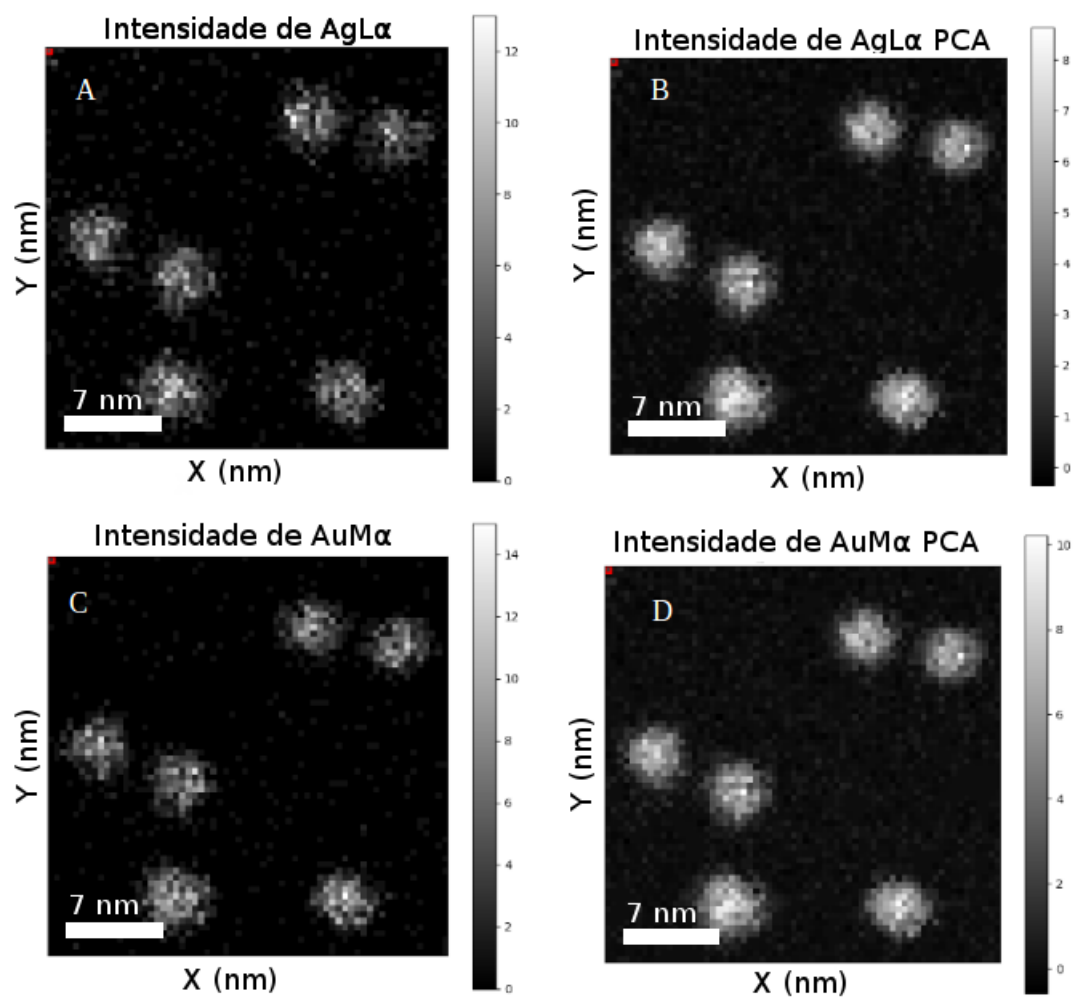


Figura 53 – Mapas elementais gerados por STEM-EDS de nanopartículas de AgAu. Intensidades de A) AgL α , B) AgL α pós PCA, C) AuM α e D) AuM α pós PCA.

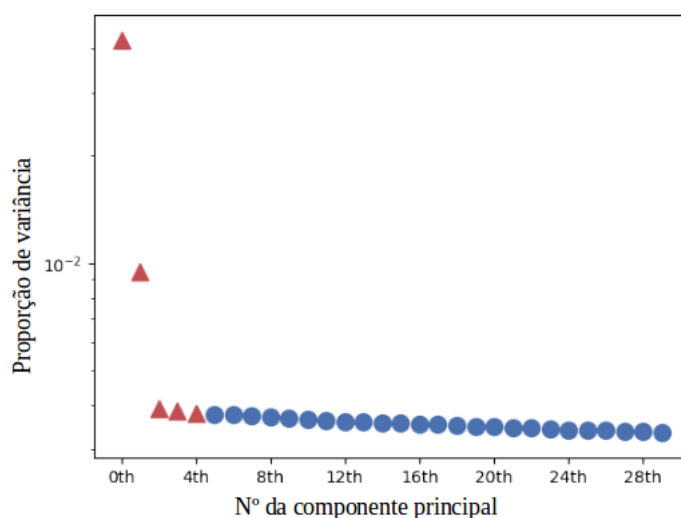


Figura 54 – Gráfico da proporção das variâncias das componentes geradas pelo PCA aplicado nos cubos de dados de STEM-EDS das nanopartículas de AgAu, as variâncias em vermelho representam as variâncias a serem utilizadas na reconstrução do conjunto de dados e as azuis o resíduo a ser descartado como ruído.

Devido à necessidade de quantificar a composição química de um grande número de nanopartículas, é necessária a seleção automática dos espectros de Raio X correspondentes às nanopartículas, excluindo o máximo possível de sinal de fundo, melhorando a relação sinal-ruído. O processamento automático é feito para a minimização de qualquer subjetividade na análise dos dados e, para isso, foi implementado um método de identificação automática das partículas na imagem espectral.

Após a aplicação de PCA nos cubos de dados, as imagens espectrais são binarizadas, ou seja, o fundo se torna 0 e os objetos se tornam 1. O parâmetro de corte utilizado na máscara é a contagem por pixel e para definição do que é partícula e o que é fundo são utilizados de 2 a 3 contagens de fótons de Ag e de Au. Em seguida, um algoritmo de segmentação e rotulação chamado *watershed*, do pacote de python para processamento de imagens chamado *scikit-image* (WALT et al., 2014), foi utilizado para identificar e separar cada objeto presente na imagem binarizada, atribuindo diferentes valores para as intensidades dos pixels conforme mostrado na figura 55. Caso haja alguma nanopartícula muito próxima da outra, o processamento se torna capaz de separá-las devido ao algoritmo de segmentação. Com as nanopartículas já identificadas, um outro algoritmo é utilizado para ajustar uma elipse de mesma área da nanopartícula e assim é selecionada uma região circular como tamanho da nanopartícula, de raio equivalente ao eixo principal da elipse ajustada, o que permite medir o tamanho das nanopartículas analisadas e também obter as coordenadas das regiões circulares, como pode ser visto na figura 55.

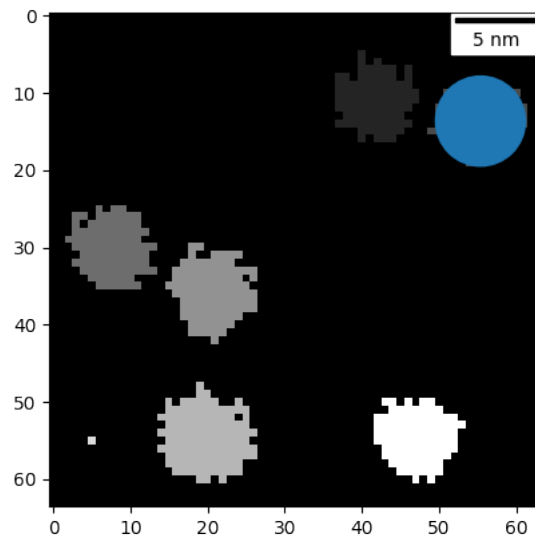


Figura 55 – Imagem segmentada das nanopartículas de AgAu e medida do tamanho de uma partícula, em azul.

Todo o processamento de dados foi implementado em python especificamente para este projeto para tornar tudo semi-automatizado, com pouca ou nenhuma intervenção do usuário e assim, na identificação automatizada das nanopartículas, o PCA desempenha uma função muito importante com a redução de ruído, pois com os dados filtrados a probabilidade de se identificar as partículas corretamente se torna maior. A figura 56 compara os resultados da seleção automática de nanopartículas de um conjunto de dados com e sem a redução de ruído por PCA. Na figura 56a a identificação das nanopartículas ocorreu no cubo de dados bruto e devido a dificuldade de executar a segmentação e rotulação, foram identificados 12 objetos diferentes com exceção do fundo e na figura 56b, a identificação ocorreu no cubo de dados onde PCA foi aplicado, identificando apenas 4 objetos além do fundo.

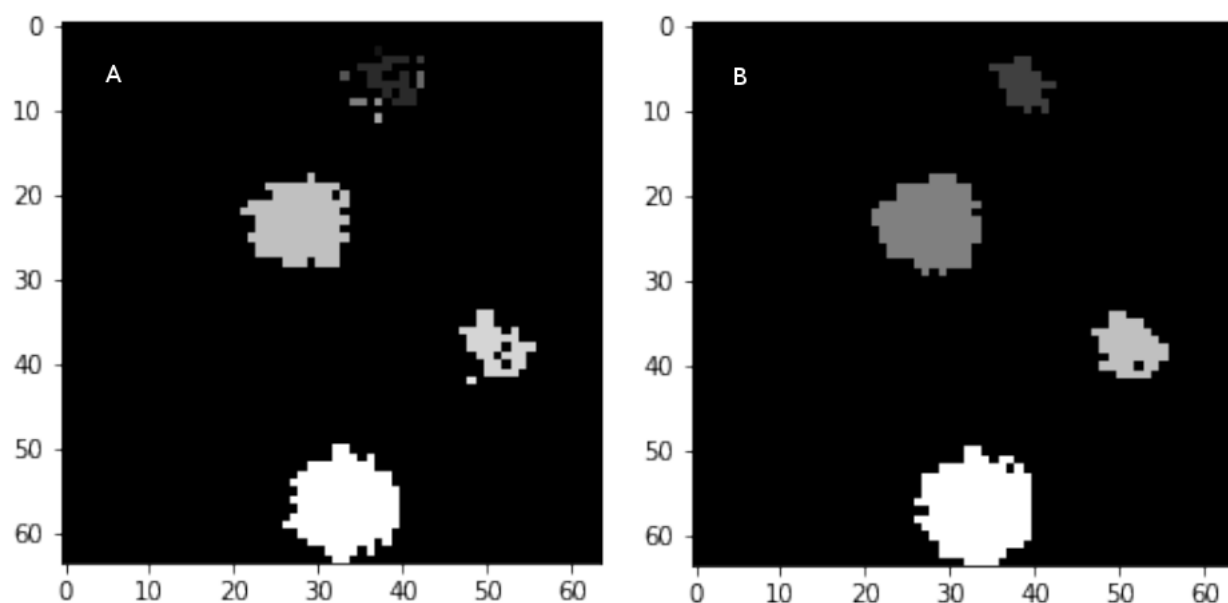


Figura 56 – Comparação do efeito do PCA na identificação das nanopartículas. a) Sem redução de ruído por PCA e b) com redução de ruído por PCA.

Utilizando apenas os pixels pertencentes às regiões circulares que definem o tamanho das partículas e somando mais 1 pixel no raio dessa região para garantia de que toda a partícula seja contemplada, os espectros de todos os pixels são somados, gerando um espectro da composição média da nanopartícula. Com este espectro é selecionada a região de interesse das linhas de emissão $\text{AgL}\alpha$ e $\text{AuM}\alpha$ e feito um ajuste do espectro a ser integrado para obter as contagens, conforme ilustrado pela figura 57.

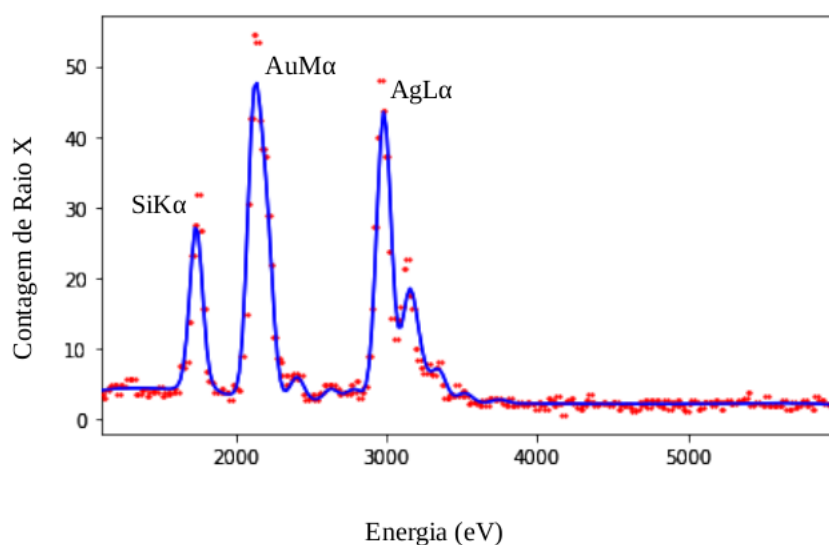


Figura 57 – Ajuste do espectro de EDS da nanopartícula selecionada na figura 55

Integrando os picos de sinal de ouro e prata no espectro total da nanopartícula

de AgAu e utilizando o método de Cliff-Lorimer calibrado com o uso filme de AgAu, é possível obter a composição química da nanopartícula. Este processamento é então aplicado de maneira automatizada em todas as nanopartículas, de todos os cubos de dados, das três amostras que foram preparadas, para investigar a composição das nanopartículas bimetálicas sintetizadas.

Utilizando o mesmo equipamento mas no modo TEM-EDS, foram também coletados espectros das nanopartículas em uma área muito maior, obtendo informação de milhares de nanopartículas ao mesmo tempo. Neste modo, o feixe paralelo compreende uma área grande, com ele não é possível concentrar muitos elétrons em um mesmo ponto e não é possível gerar mapas elementais, mas é possível obter informação composicional média das nanopartículas.

Para a amostra feita com um alvo metálico de 1:1 fios de ouro e prata, foram analisadas 61 nanopartículas. Com alvo metálico de 1:2 fios de ouro e prata respectivamente, foram analisadas 58 nanopartículas. E para a amostra com alvo metálico de 1:3 fios de ouro e prata foram analisadas 51 nanopartículas. Assim, os resultados obtidos para as quantificações das composições médias e individuais das nanopartículas de AgAu encontram-se na figura 58, onde as composições individuais estão graficadas em ordem temporal de aquisição.

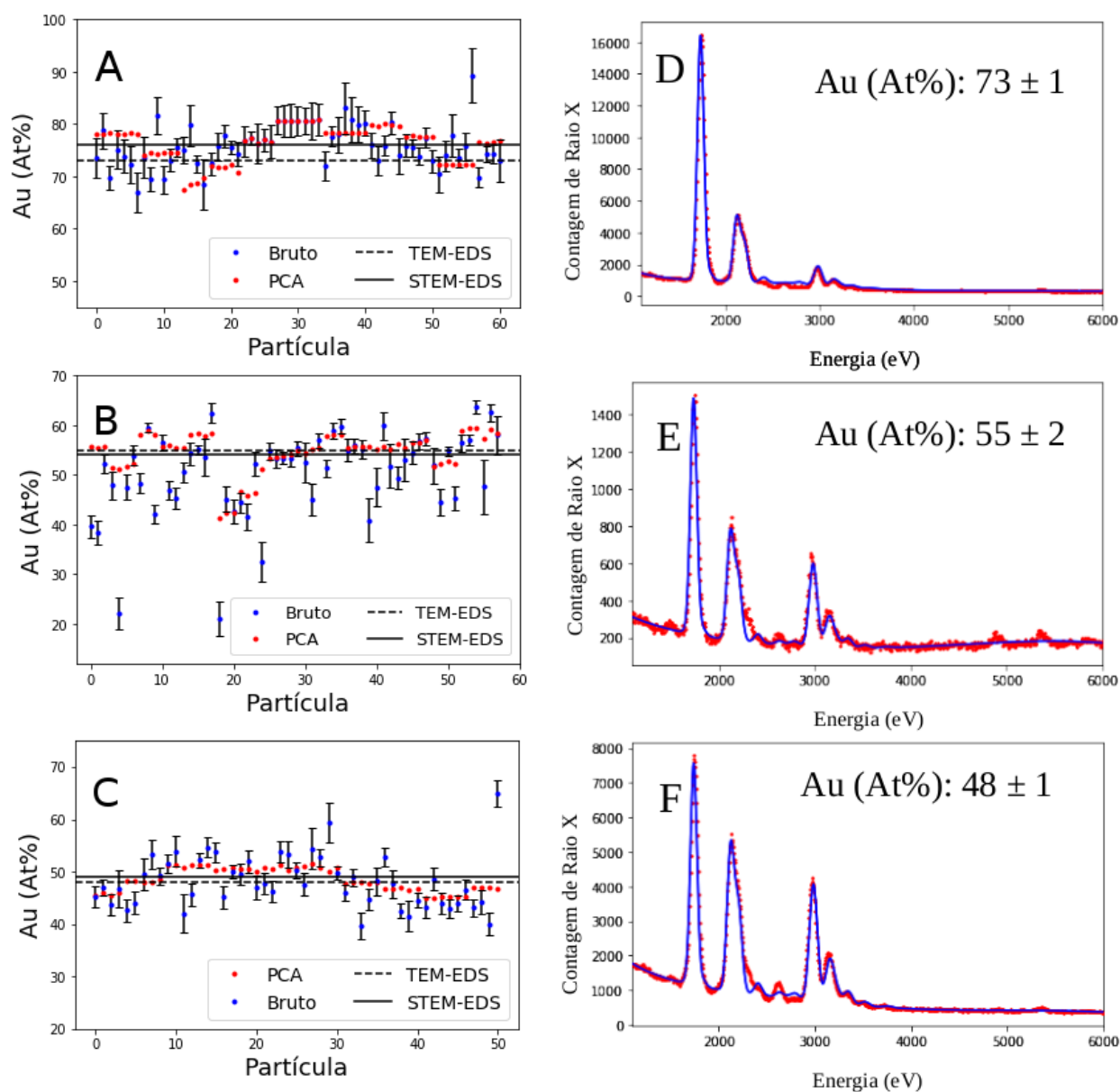


Figura 58 – Composições químicas de NP's de AgAu obtidas de três sínteses diferentes analisando partículas individuais por STEM-EDS e espectros de TEM-EDS para análise das composições médias. Composição química de A) 61 NP's amostra 1:1, B) 58 NP's amostra 1:2 e C) 51 NP's amostra 1:3 analisadas com PCA em vermelho e sem PCA em azul, linha tracejada composição média obtida por TEM-EDS e linha cheia composição média das nanopartículas individuais analisadas por STEM-EDS e processadas por PCA. D) Espectro de EDS em vermelho e ajuste do espectro de TEM-EDS da amostra em azul 1:1, E) 1:2 e F) 1:3.

Os valores para a composição média das nanopartículas por TEM-EDS e STEM-EDS foram obtidos com suas respectivas incertezas com 1σ de confiabilidade, onde as incertezas foram calculadas através da propagação de erros da equação (3.9). Para as medidas de partículas individuais o desvio padrão da média das distribuições da figura 58 pode ser utilizado com incerteza da composição média medida. Os valores obtidos se

encontram na tabela 2 abaixo.

	Amostra 1:1	Amostra 1:2	Amostra 1:3
TEM-EDS (At%)	73 ± 1	55 ± 2	48 ± 1
STEM-EDS (At%)	76 ± 4	49 ± 9	48 ± 5
PCA-STEM-EDS (At%)	76 ± 3	54 ± 4	49 ± 2

Tabela 2 – Valores da composição química média das amostras de nanopartículas de AgAu de três sínteses diferentes em porcentagem de átomos de Au.

Os resultados apresentados na figura 58 e na tabela 2 apontam que, embora PCA atue como redutor de ruído reduzindo o desvio padrão da distribuição dos pontos ao redor do valor da composição média, existe um erro sistemático na quantificação devido ao processamento por análise de componentes principais.

A figura 59 ilustra as composições individuais das nanopartículas da amostra 1:3, onde uma região de interesse é selecionada para ilustrar como a distribuição dos pontos se separam por por cubos de dados, separados por linhas verticais e em ordem temporal de aquisição. Note que após o processamento por PCA, as nanopartículas de um mesmo cubo de dados passam a ter composições químicas muito próximas, o que pode indicar que a informação associada às pequenas diferenças entre as partículas desaparece após o uso do filtro.

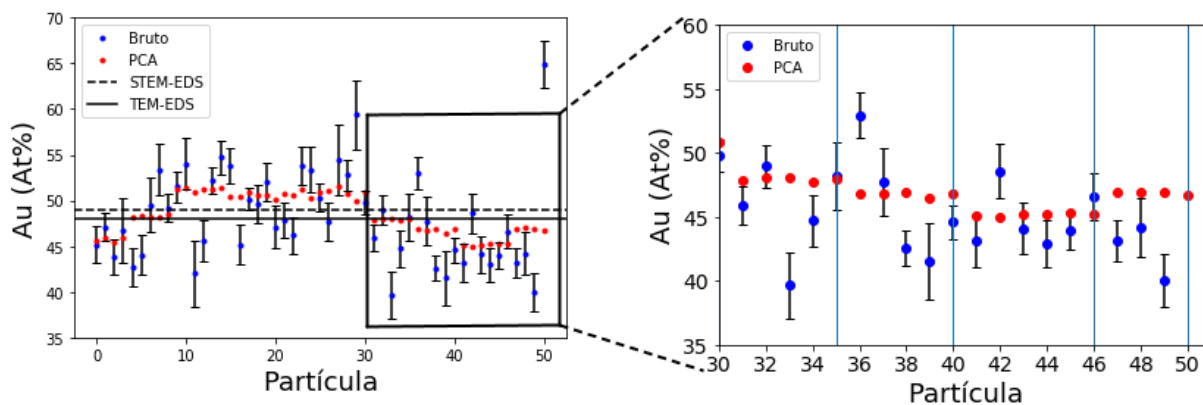


Figura 59 – Distribuição de composições químicas individuais de nanopartículas de AgAu provenientes da amostra 1:3. Em azul dados brutos sem redução de ruído por PCA e em vermelho dados filtrados utilizando PCA. Uma região de interesse é selecionada para melhor visualização das composições químicas das NP's, separadas por linhas azuis verticais, que delimitam diferentes cubos de dados processados por PCA.

Com o intuito de melhor verificar a indução de artefatos devido ao uso de PCA para reconstrução dos dados, foi construído um "mega" cubo de dados com duas populações composicionais diferentes, utilizando dois mapeamentos da amostra 1:1 e dois mapeamentos

da amostra 1:3, conforme ilustrado pela figura 60, e neste conjunto de dados foi aplicado todo o processamento para quantificação composicional das nanopartículas.

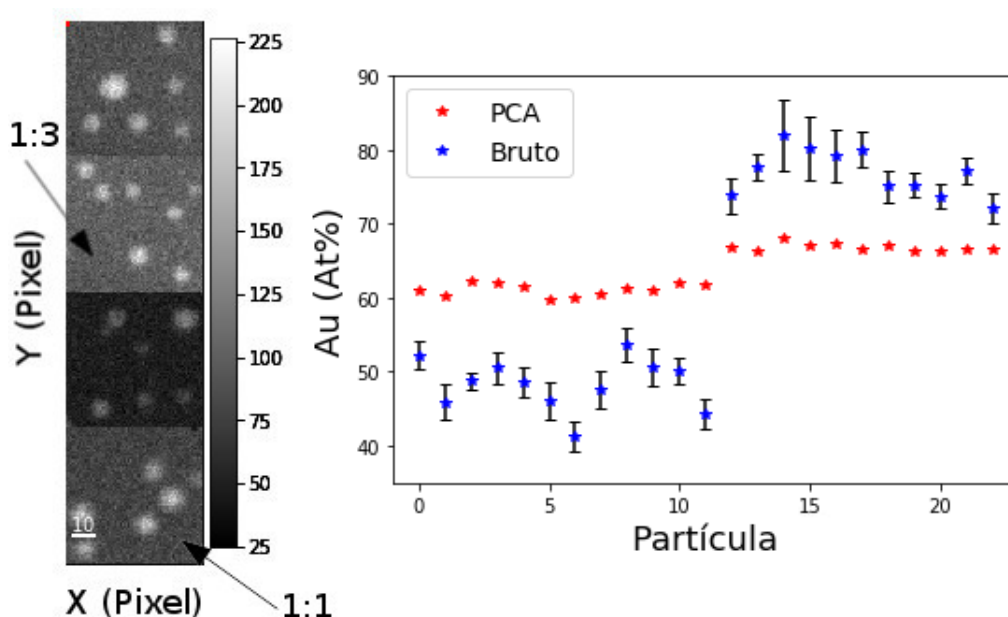


Figura 60 – "Mega" cubo de dados gerado acoplando 4 mapeamentos de duas composições químicas diferentes e gráfico das composições individuais das NP's com PCA em vermelho e bruto em azul.

Novamente, é verificado uma distinção entre as distribuições dos pontos com PCA e sem PCA, ilustrando o efeito de induzir as composições químicas filtradas por PCA à um valor próximo da composição média do cubo de dados. Então, conforme descrito em 3.3.2 e simulado em 4.1, é introduzido um *bias* nos dados filtrados por PCA, o que impõe limitações no uso da técnica para quantificação composicional individual com precisão e impede a devida estimativa de uma barra de erros.

4.5 Verificação do efeito de pulverização do alvo metálico na composição obtida na síntese das nanopartículas de AgAu

Para verificar se essa hipótese é verdadeira, duas amostras foram preparadas, uma com um alvo metálico de 1:1 fios de ouro e prata, para a verificação da composição da síntese ao longo do tempo, levando em consideração que a sobrevivência de um alvo metálico é em média de 5h, uma amostra foi feita com 1h e outra com 4h de alvo pulverizado.

Para verificar a composição química destas duas sínteses o mesmo método de quantificação por TEM-EDS foi utilizado e os espectros mostrados na figura 61, onde os valores obtidos para as composições médias foram $(72 \pm 3)\%$ e $(69 \pm 3)\%$ para as amostras respectivamente depositadas após uma hora e quatro horas de pulverização.

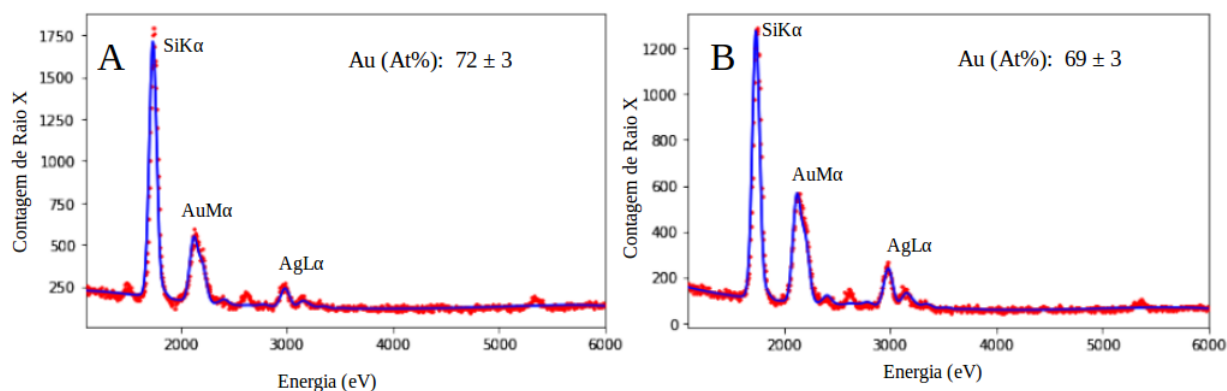


Figura 61 – Espectros TEM-EDS ajustados para quantificação de composição química de amostras feitas com fio metálico 1:1 com diferentes tempos de pulverização. A) Amostra depositada após 1h de pulverização e B) amostra depositada após 4h de pulverização.

Também foi realizada a quantificação da composição química de nanopartículas dessa síntese por STEM-EDS, onde a amostra analisada foi a depositada após 4 horas de pulverização do alvo metálico, o resultado obtido é apresentado no gráfico da figura 62, onde foram utilizados três mapas elementais para analisar 20 nanopartículas de AgAu e as composições médias dessas nanopartículas quantificadas sem e com PCA foram $(63 \pm 8)\%$ e $(69 \pm 2)\%$ respectivamente.

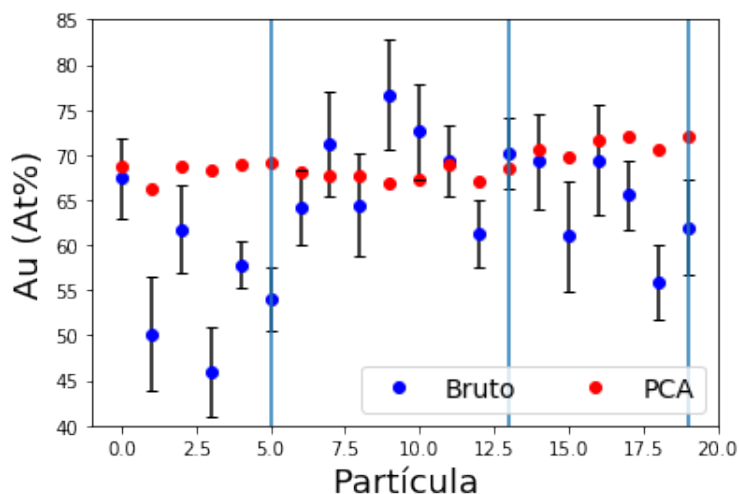


Figura 62 – Gráfico da composição de Au em porcentagem de átomos de 20 nanopartículas de AgAu com e sem a redução de ruído por PCA.

4.6 Redução de ruído por PCA na quantificação de nanofios InGaP.

Como a análise quantitativa de nanopartículas de AgAu de tamanhos diminutos (3 nm - 9 nm) se mostrou complexa, para avaliar a qualidade da redução de ruído por PCA na determinação da composição química de nanopartículas individuais, um novo conjunto

de dados com mais mais contagens por pixel foi proposto para a análise quantitativa da composição química de um nanossistema, e assim reforçar o uso desta metodologia de filtro de ruído como pré-processamento de imagens espectrais de EDS.

O conjunto de dados usado foi cedido pelo Prof. Dr. Daniel Ugarte (DFA) e se trata de um mapa elemental de $27 \times 281 \times 4000$ voxels, de um nanofio semiconductor InGaP catalisado por uma nanopartícula de Au crescido pela técnica CBE no grupo de pesquisa da Prof. Dr^a. Mônica Cotta (DFA). A morfologia do nanofio é ilustrada esquematicamente na figura 63, indicando a nanopartícula de Au na extremidade, InP ao longo de seu comprimento e InGaP na sua base.

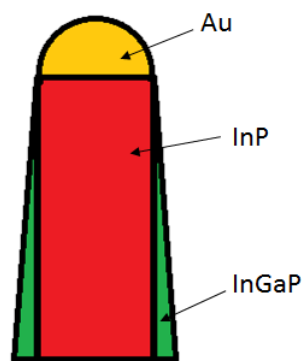


Figura 63 – Esquemático do nanofio semiconductor de InGaP crescido pela técnica CBE à partir de uma nanopartícula de Au.

Na figura 64, segue o mapas elementais associados ao nanofio de InGaP, utilizando as intensidades de fótons de Raios X presentes nos pixels que correspondem ao nanofio, inclusive o sinal de Au da nanopartícula catalisadora do seu crescimento. As intensidades foram obtidas fazendo um ajuste de todos os espectros, pixel a pixel, e integrando as curvas associadas às linhas de emissão do elemento de interesse em cada pixel, obtendo assim um mapa elemental do objeto.

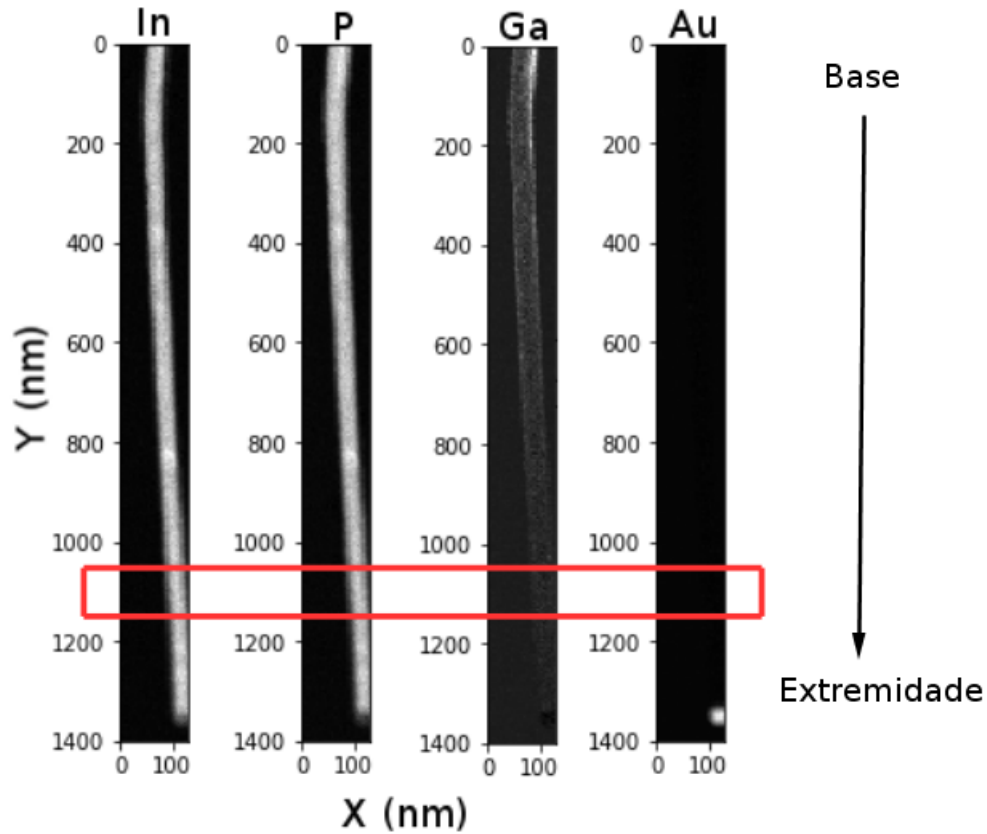


Figura 64 – Mapas elementais do nanofio de InGaP feitos com as intensidades de Raios X característico dos elementos pertencentes ao material. Em vermelho região de interesse para calibração da quantificação, onde as contagens de Ga tendem a zero.

De acordo com a figura 64, é visível que na base da estrutura o sistema é rico em Ga, que In e P compõe todo o nanofio e que sua extremidade é composta por Au, o que condiz com a técnica de crescimento utilizada. Todo o processamento de dados dos nanofios apresentados à seguir foi realizado em conjunto com o Prof. Dr. Daniel Ugarte.

A mesma metodologia de processamento de dados em python utilizada nas nanopartículas é então utilizada no nanofio. O PCA é aplicada como filtro de ruído com o intuito de reduzir principalmente o ruído poissoniano da imagem hiperspectral. É de interesse, que apenas os espectros dos pixels pertencentes ao nanofio sejam integrados na análise quantitativa, para reduzir a integração de ruído de fundo. Assim, o centro da estrutura é determinado ao longo do nanofio e com a derivada das coordenadas dos centros ao longo do fio, vetores tangentes a estes pontos são definidos e explorando os planos à que esses vetores são ortogonais, é possível definir linhas transversais de pixels à terem suas contagens integradas conforme ilustrado pela figura 65.

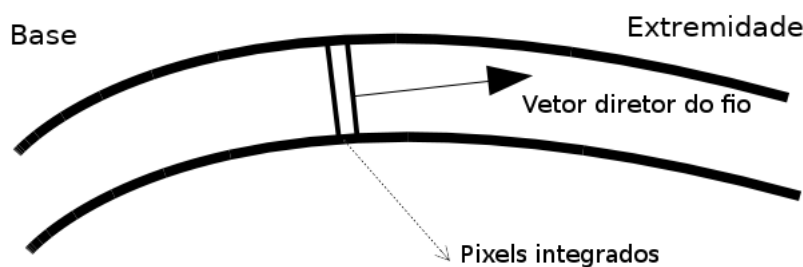


Figura 65 – Esquemático de como o algoritmo obtém contagens das coordenadas de interesse, ignorando as contagens que não pertencem ao nanofio.

As contagens de cada linha podem então ser utilizadas para avaliar qualitativamente o perfil da composição química ao longo do nanofio, como é mostrado na figura 66, onde são mostrados, lado a lado, os gráficos das contagens ao longo do nanofio do mapa sem redução de ruído e do mapa com redução de ruído por PCA.

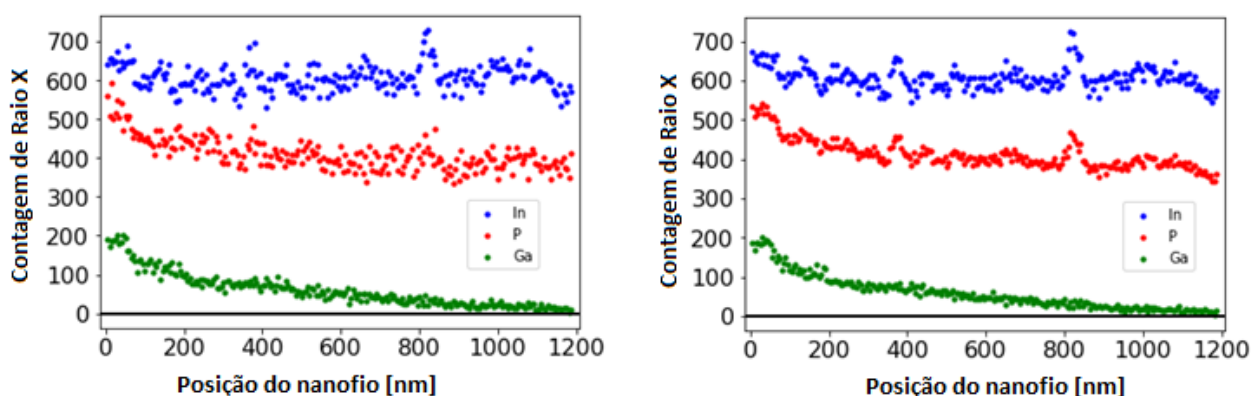


Figura 66 – Contagens de Raios X característico obtidas integrando as intensidade de pixels linha por linha do mapa elemental do nanofio de InGaP. À esquerda resultados referente aos dados brutos e à direita aos dados filtrados por PCA.

Para analisar de maneira quantitativa a composição química do nanofio foi, novamente, utilizado o método de Cliff-Lorimer. Sabendo que o nanofio é um liga ternária semicondutora, para facilitar a quantificação, foi utilizado do fato que o gálio passa a ser substituído por índio ao longo do fio e portanto, o sinal de Raios X característico do gálio tende a zero na sua extremidade, antes de chegar na nanopartícula de ouro. Portanto, nessa região do nanofio, identificada em vermelho na figura 64, de 1085 nm a 1185 nm, a liga é binária. Sendo composta por índio e fósforo. Assim, assumindo a composição de 1:1 para os dois elementos, a constante de calibração pode ser estimada de modo a possibilitar a visualização da melhoria na quantificação devido à redução de ruído por PCA. Vale destacar que é de vital importância o entendimento de que, na ausência de uma amostra de referência de composição conhecida para a calibração, a composição química medida se trata de uma estimativa. O valor estimado para a calibração em porcentagem de átomos é

de $K_{InP} = 0.63 \pm 0.01$ e à partir desse valor, a razão das composições químicas de In e P obtidas são expressas na figura 67, onde é possível comparar o efeito da redução de ruído utilizando o PCA como filtro em uma quantificação com número razoável de contagens.

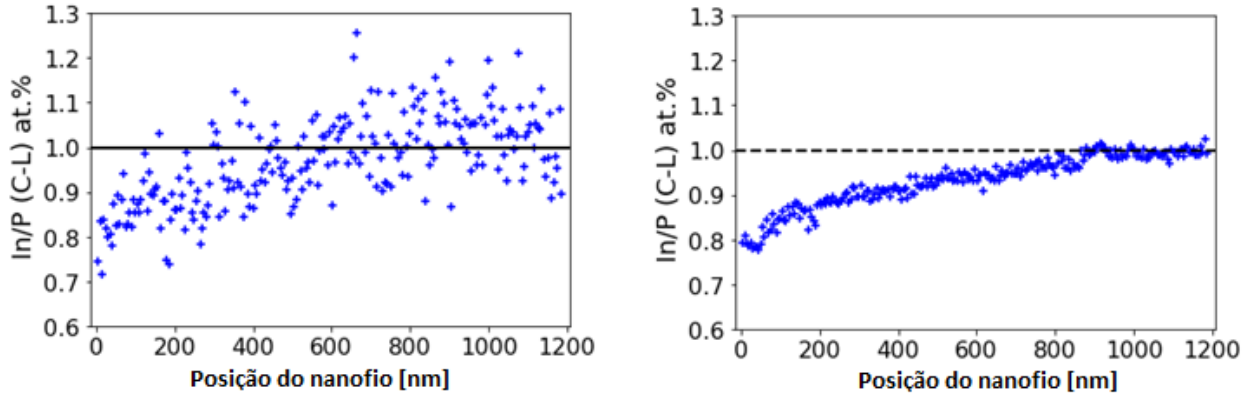


Figura 67 – Gráficos da razão In/P em porcentagem de átomos ao longo do nanofio. À esquerda, conjunto de dados bruto sem filtro por PCA e à direita conjunto de dados filtrado por PCA.

Nessa situação é verificável o enriquecimento de In ao longo do sistema e não é possível identificar nenhuma introdução de artefatos ou *bias* devido ao PCA pois, se o comportamento fosse semelhante ao identificado na situação das nanopartículas, a composição química não iria variar ao longo do nanofio, seriam todos os pontos valores muito similares de composição. Assim, nessa condição é válido estimar uma barra de incertezas para os dados filtrados por PCA, o que não pode ser feito para o sistema anterior devido a introdução de *bias* na distribuição da composição química. Essa estimativa pode ser feita selecionando uma região do nanofio onde a composição química seja aproximadamente uniforme, sendo assim, a região 530 nm - 630 nm foi selecionada e as contagens correspondentes à esta região são analisadas com respeito à sua dispersão, conforme segue na figura 68.

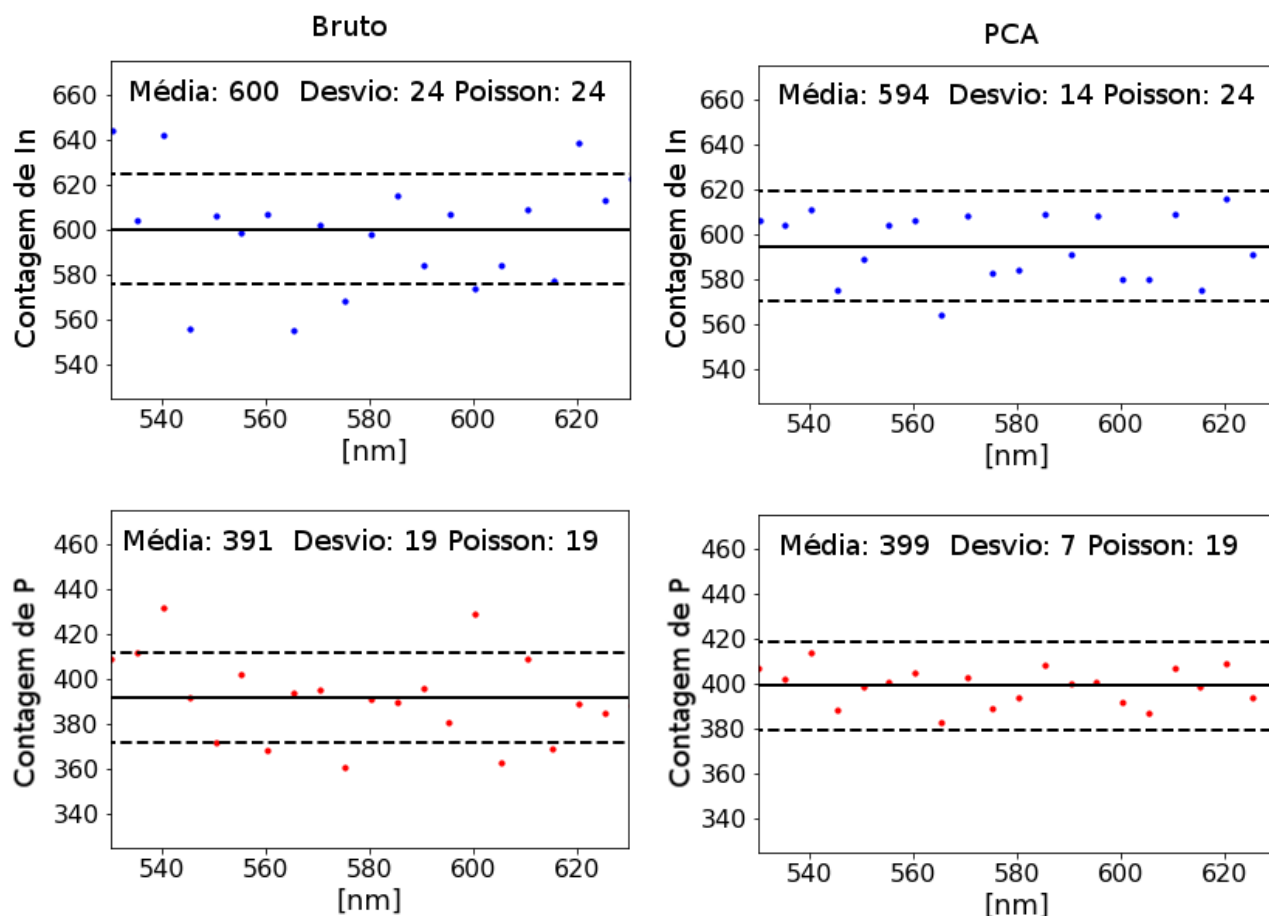


Figura 68 – Gráficos das contagens de In e P dos dados brutos e dos dados filtrados por PCA com seus respectivos desvio padrão, média e incerteza de Poisson da contagem média.

Nos dados brutos o desvio padrão da distribuição das contagens é igual a incerteza poissoniana calculada com a contagem média, o que indica que para uma composição química uniforme, a distribuição das contagens de fato tem como motivo de flutuações o ruído poissoniano. Após o PCA, a contagem média varia pouco e portanto, o ruído não é mais puramente de natureza poissoniana, já que o desvio padrão diminuiu aproximadamente 1.7 para as contagens de In e 2.7 para as contagens de P. Superestimando a incerteza, é possível assumir que a incerteza final da medida é a incerteza poissoniana vezes um fator multiplicativo de quanto o desvio padrão das contagens diminuiu. Assim, a barra de incerteza estimada para a quantificação composicional da imagem espectral do nanofio, filtrada por PCA, é dada propagando esta ideia para a barra de incerteza final da composição química. Então, calculando a barra de incerteza para os pontos dos dados brutos e corrigindo por esse fator redutor, devido à dispersão das contagens, o que se obtém é o exposto na figura 69.

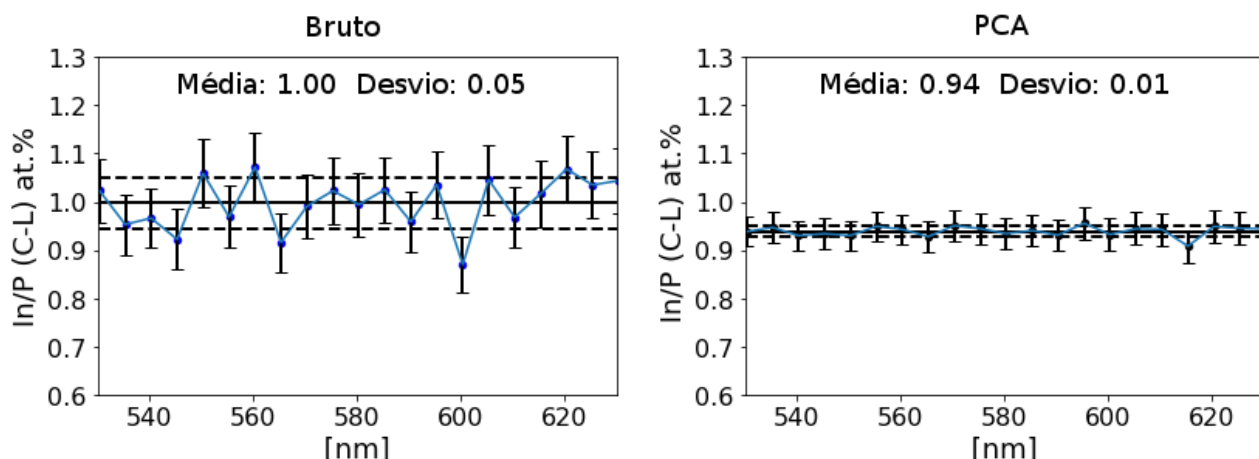


Figura 69 – Gráficos das composições químicas de uma região de interesse para a análise da redução de ruído. À esquerda quantificação composicional dos dados brutos e à direita dados filtrados por PCA

O desvio padrão das distribuições de composição antes do filtro por PCA e depois do filtro, tem um fator 5 de diferença, indicando que mesmo que o ruído tenha sido reduzido drasticamente, as barras de incerteza ainda estão subestimadas.

4.7 Aumentando contagens - Medidas à 80 kV

À partir das simulações da seção 4.1 e da análise do nanofio de InGaP da seção 4.6 temos que ao obter mais contagens de Raio X o efeito de *bias* estatístico na reconstrução dos dados por PCA é reduzido. Isso torna possível utilizar PCA como filtro de ruído nas imagens espectrais.

Assim, aumentando as contagens de Raio X característico, o sinal das pequenas variações de composição química entre uma nanopartícula e outra pode ser distinguido do ruído pelo PCA. Para otimizar a precisão da quantificação composicional das nanopartículas de AgAu é necessário obter mais contagens na aquisição dos dados. Para isso, outros microscópios eletrônicos de transmissão foram explorados, buscando medidas quantitativas com menor incerteza ao explorar um maior ângulo sólido de coleção de Raio X e uma menor energia de aceleração do feixe de elétrons.

O microscópio utilizado inicialmente neste trabalho, foi o modelo JEM 2100F à 200 kV do LNNano, que possui um espaçamento muito pequeno entre as peças polares superior e inferior da lente objetiva, o que reduz o ângulo de coleção de Raio X característico mesmo para uma grande área de detecção, conforme ilustrado esquematicamente pela figura 70. Assim, utilizando o microscópio modelo FEI Tecnai F20 à 200 kV do LCE/DEMa da UFSCar, que possui maior espaçamento entre as peças polares, o mesmo experimento de STEM-EDS foi realizado para quantificar a composição química das nanopartículas. No

entanto, as contagens obtidas foram um fator 2 menor que as obtidas nos experimentos do microscópio anterior. Embora o espaçamento das peças polares seja maior, a área de coleção do detector de Si(Li)(30mm^2) utilizado pelo FEI Tecnai é inferior ao do SDD(*Silicon Drift Detector*)(80mm^2) utilizado pelo JEM 2100F.

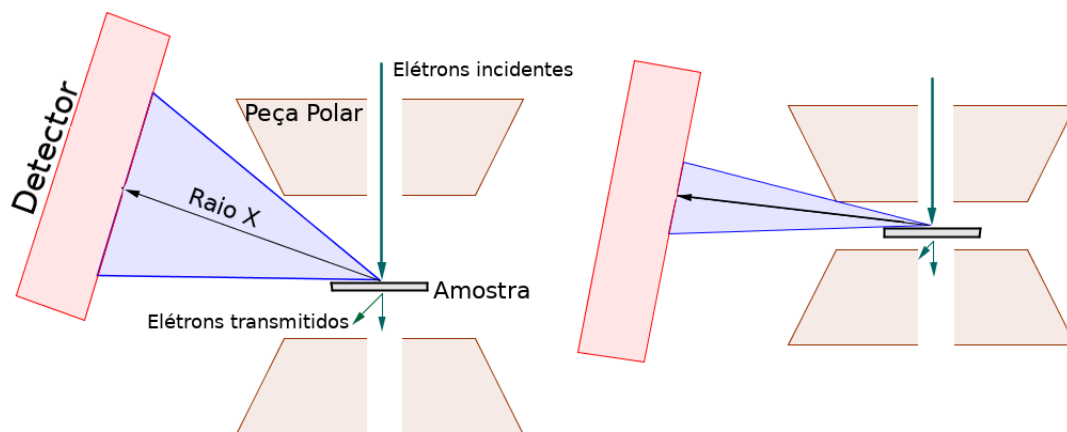


Figura 70 – Ilustração esquemática da geometria da lente objetiva e do sistema de detecção. À esquerda uma lente objetiva com grande espaçamento entre as peças polares, permitindo que um maior ângulo sólido de Raio X emitido possa ser coletado pelo detector. À direita o mesmo sistema, mas com um espaçamento entre as peças polares reduzido, limitando o ângulo sólido de coleção de Raio X característico mesmo com um detector de grande área.

Dois outros microscópios foram explorados para otimizar as contagens, os modelos Cubed Titan-Themis do LNNano e também o novo microscópio analítico da JEOL JEM-F200 "F2". As medidas nesse último microscópio foram feitas na fábrica da JEOL, no Japão, através colaboração com o Prof. Daniel Ugarte. Ambos os microscópios possuem alta estabilidade e ofertam um sistema de coleção de Raio X robusto, com grandes ângulos de coleção, fontes de elétrons de alto brilho e detectores com grande área, além da possibilidade de operação com o feixe de elétrons acelerados à 80 kV. Os experimentos realizados nos dois microscópios foram feitos em condições similares aos do JEM 2100F, sendo mapas elementais de 64×64 pixels com 200ms de exposição por pixel para que possam ser comparados. As medidas realizadas nesses dois microscópios apresentaram muito mais contagens de Raio X do que os experimentos realizados no JEM 2100F, conforme pode ser verificado no gráfico da figura 71, onde os dados coletados no microscópio Titan à 80 kV são os que foram obtidas maiores contagens.

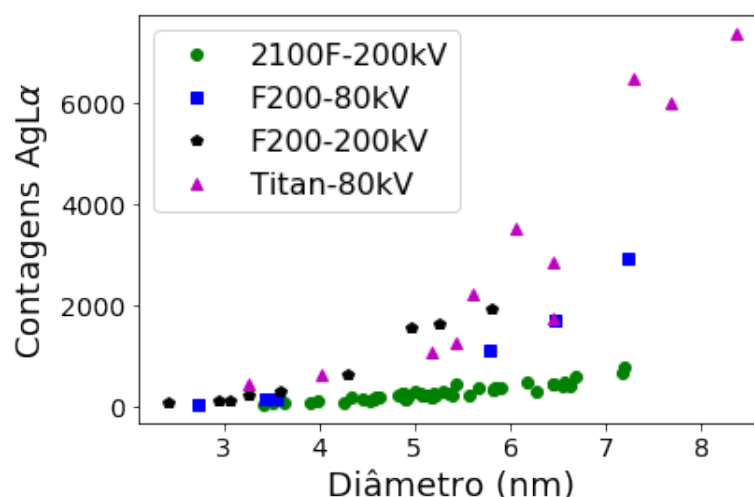


Figura 71 – Gráfico das contagens de AgL α em função do diâmetro das nanopartículas de AgAu.

As contagens médias obtidas nos experimentos Titan-80kV e 2100F-200kV são 3300 e 300 respectivamente. Isso pode ser justificado, pela seção de choque de ionização ser aproximadamente duas vezes maior para a energia do feixe à 80 kV do que à 200 kV. Além disso, o microscópio Titan possui quatro detectores ao invés de apenas um, conforme ilustrado pela figura 72, onde os detectores se posicionam ao redor da amostra espaçados em 90°. Considerando estes dois fatores, a contagem esperada seria de 8 vezes maior em comparação a contagem do experimento 2100F-200kV, sendo que na prática se obtém um fator 10.

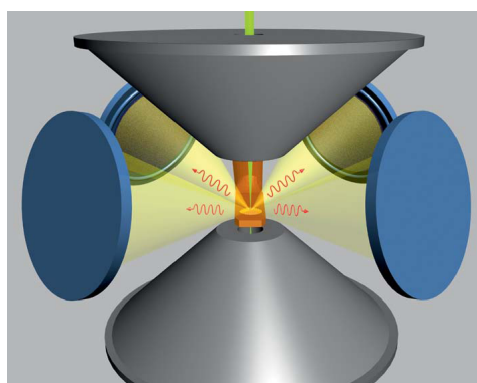


Figura 72 – Esquemático do sistema de detecção utilizado no microscópio Cubed Titan-Themis

Uma imagem espectral obtida no Titan à 80 kV pode ser observada na figura 73. Utilizando dois cubos de dados adquiridos neste experimento e realizando os procedimentos proposto neste trabalho de quantificação composicional, com e sem redução de ruído por PCA, obtimos a composição química individual das nanopartículas de AgAu apresentadas no gráfico da figura 73.

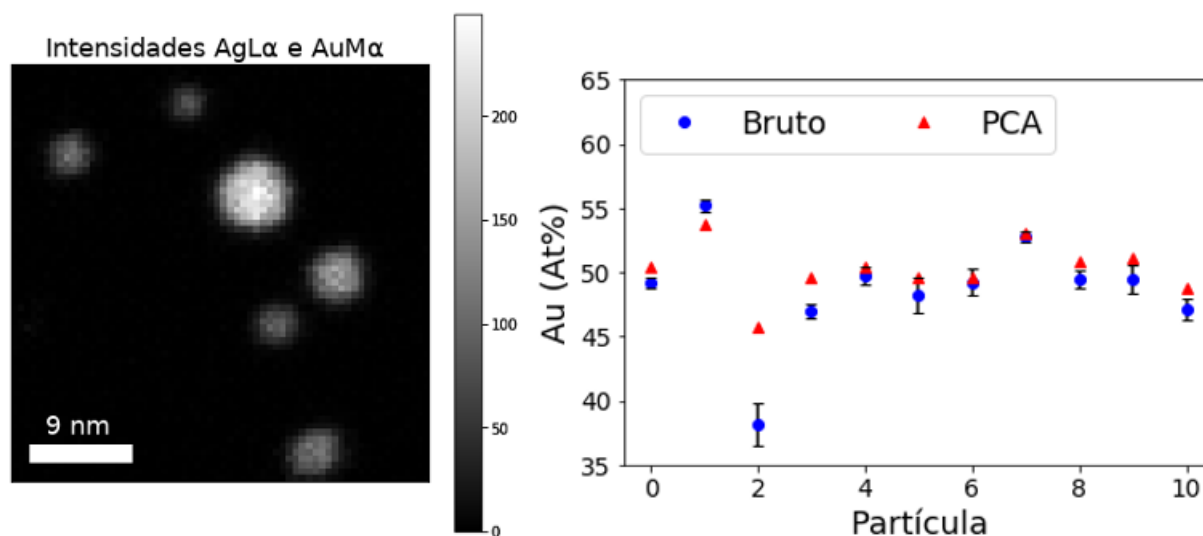


Figura 73 – Mapa elemental STEM-EDS gerado pelas intensidades de $\text{AgL}\alpha$ e $\text{AuM}\alpha$ e gráfico das composições químicas individuais das nanopartículas de AgAu.

No gráfico da figura 73, é possível verificar que a composição química das nanopartículas de AgAu de diâmetros de 3 nm à 8 nm, medidas por STEM-EDS, não possui valores iguais como nas composições químicas das figuras 58 e 59, revelando que ao aumentar as contagens em um fator 10, o *bias* estatístico gerado na reconstrução dos dados nas componentes principais desaparece. Isto ocorre pois a variância correspondente às pequenas variações de composição entre uma partícula e outra se sobressai ao ruído. Permitindo assim, que a composição química seja quantificada com redução de ruído por PCA e sem a introdução de artefatos.

Apesar disso devemos considerar que mesmo na condição em que o PCA atua como redutor de ruído, sem introdução de erros sistemáticos, a barra de incerteza ainda é um problema à ser resolvido. O fato das nanopartículas possuírem uma distribuição larga de tamanhos, dificulta a determinação do quanto o filtro de ruído diminui a incerteza da medida, observando a razão do desvio padrão da distribuição dos pontos, com e sem PCA, como feito para a região de composição homogênea do nanofio de InGaP. Portanto, são necessários mais pontos e de partículas de mesmo tamanho para se estimar um valor para a redução da barra de incerteza devido à redução de ruído. Ainda assim, o efeito da redução de ruído, pode ser visualizado na redução da dispersão dos pontos no gráfico da figura 73 e também ao observar na figura 74, a redução de ruído em espectros de um único pixel pertencentes à uma nanopartícula do mapa elemental.

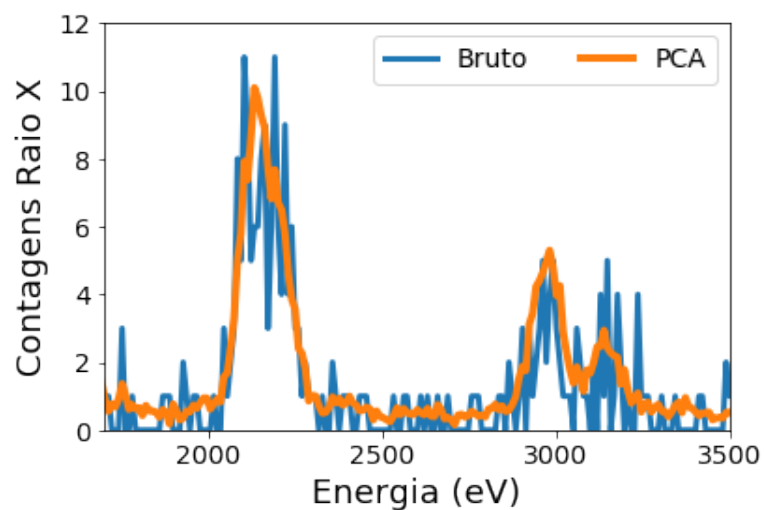


Figura 74 – Espectros de um único pixel do cubo de dados de um mapeamento elemental de nanopartícula de AgAu. Em Azul espectro do conjunto de dados bruto e em laranja do conjunto de dados processado por PCA.

5 Discussão

Fabricamos nanopartículas de AgAu em três condições diferentes, uma utilizando um fio de ouro e um fio de prata (1:1), outra utilizando um fio de ouro e dois de prata (1:2) e outra com um fio de ouro e três de prata (1:3).

A amostra 1:1 apresentou uma composição média em porcentagem de átomos de Au de $(73 \pm 1)\%$ medida por TEM-EDS. Esse valor está de acordo com a composição média obtida ao medirmos nanopartículas individuais utilizando STEM-EDS, sendo essa de $(76 \pm 3)\%$. Esses valores indicam, que as composições químicas medidas isoladamente seguem uma distribuição de valores bem definida ao redor da composição média. A composição química no entanto, não foi o que esperávamos, levando em consideração a taxa de pulverização dos elementos, utilizados como material para preparo das nanopartículas. A energia estimada do plasma de argônio utilizado na pulverização, é da ordem de 100 eV e para essa energia, a taxa de remoção de átomos de Ag seria, aproximadamente, o dobro da taxa de remoção de átomos de Au, o que implicaria em uma nuvem atômica cuja composição esperada seria da ordem de 33% de ouro, devido a estimativa da área exposta de cada elemento no alvo metálico ser de 1:1. Com uma nuvem atômica com composição química de 33% de átomos de Au, o que esperávamos era observar nanopartículas com aproximadamente essa mesma composição, valor muito diferente do que foi medido nas nanopartículas.

Uma possível justificativa para a composição que observamos, é que durante a execução da síntese, mais átomos são removidos do fio de prata do que do fio de ouro e assim, a área exposta do alvo metálico muda ao longo do tempo. Fato este, que poderia levar à uma variação da composição química da nuvem atômica, gerada em função do tempo, em que o alvo foi erodido pelo plasma de argônio. Então, isso poderia implicar em uma variação da composição das nanopartículas ao longo do tempo de pulverização.

Levando em consideração que um alvo metálico típico, dura em torno de 5h de operação da fonte de nanopartículas. Preparamos novas amostras com deposições realizadas após 1h e 4h de pulverização do alvo, com o intuito de verificar se a composição química medida, depende do quanto o alvo metálico é erodido durante uma síntese. Sendo assim, caracterizamos as duas amostras e, dentro da incerteza, o resultado obtido para as composições das partículas foi o mesmo. O que indica que a composição química encontrada, não foi consequência do quanto o alvo metálico foi erodido. Além disso, usualmente em torno de 50% do alvo metálico é consumido pela pulverização ao fim de sua vida útil, e como a composição química das nanopartículas não variou em função da erosão do alvo, a composição química obtida na síntese deve ser determinada por outros efeitos, podem

estes ser devido à termodinâmica de formação dos agregados, ou à não homogeneidade do plasma utilizado na pulverização ou ainda, devido à uma distribuição não homogênea dos átomos de diferentes elementos na nuvem atômica utilizada para crescer as nanopartículas.

O *magnetron sputtering* de simetria cilíndrica (SÁ et al., 2014), utilizado para a síntese das nanopartículas bimetálicas, permite o controle da área exposta do alvo metálico para a pulverização. Deste modo, ao aumentarmos o número de fios de determinado elemento, aumentamos a sua área exposta para extração de átomos, o que implica em um aumento da população desse elemento na nuvem atômica que precede o crescimento das nanopartículas. Sendo assim, ao aumentarmos o número de fios de prata utilizados no alvo metálico, a população de átomos de Ag na nuvem atômica aumenta e, portanto, podemos verificar se a composição química das nanopartículas geradas são sensíveis a essa variação da população de átomos de Au e Ag. Para isso, produzimos duas outras amostras, utilizando mais fios de prata.

Ao adicionarmos um fio de prata a mais no alvo (1:2), a composição química média das nanopartículas que medimos por TEM-EDS e por STEM-EDS foi de $(55 \pm 2)\%$ e $(54 \pm 4)\%$ em átomos de Au, respectivamente. Ao aumentarmos mais um fio de prata, formando um alvo com um fio de ouro e três fios de prata (1:3), a composição química que medimos por TEM-EDS e STEM-EDS foi de $(48 \pm 1)\%$ e $(49 \pm 2)\%$ respectivamente. Ou seja, a composição média das nanopartículas varia drasticamente ao aumentar de um fio de prata para dois fios de prata, mas se estabiliza ao aumentar mais um fio, o que indica uma saturação na composição ao aumentar a população de átomos de Ag na nuvem precursora da agregação.

Já foi observado pelo trabalho de (KOUSAL et al., 2018), que durante a síntese nanopartículas maiores e mais massivas tendem a estar próximas do alvo erodido pelo plasma, indicando que algo similar possa ocorrer em nossa síntese. Assim, a justificativa que propomos para a composição química medida para as nanopartículas, é que ao erodir o alvo metálico de Ag e Au, os átomos de Au, por serem mais massivos, tendem a ser removidos em um ângulo menor que os átomos de Ag. Isso faz com que o gás de arraste de argônio, guie os átomos mais leves para mais distante do alvo metálico ao longo do percurso dentro do *magnetron sputtering* cilíndrico. Este efeito está ilustrado na figura 75, onde os átomos de Ag e de Au se dispersam ao redor do alvo metálico erodido, em uma distribuição aproximadamente gaussiana.

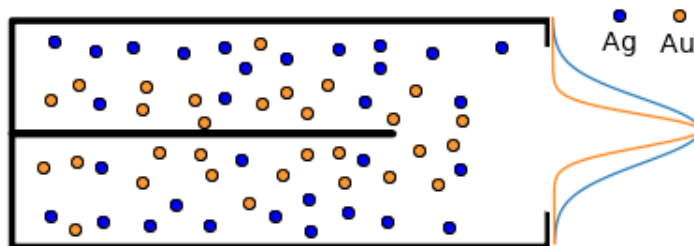


Figura 75 – Esquemático da distribuição de átomos de Ag e Au gerada pela erosão de um alvo metálico em um *magnetron sputtering* cilíndrico

Ao aumentar a quantidade de átomos de Ag na pulverização do alvo metálico, estamos alargando a distribuição de átomos de Ag gerados. Considerando que a nuvem de átomos precursora das nanopartículas é composta, aproximadamente, pelo centro das distribuições ilustradas na figura 75. Assim, ao aumentar Ag na pulverização a nuvem precursora não se enriquece de átomos de Ag na mesma proporção. Isto pode estar sendo observado em nossos experimentos, onde ao aumentar de dois fios de Ag para três, a variação na composição química é de aproximadamente 5%, enquanto ao aumentar de um fio para dois, a variação na composição química média das nanopartículas é de aproximadamente 20%.

A quantificação da composição química, depende muito da relação sinal ruído. Como realizamos os experimentos de STEM-EDS em nanopartículas, com tamanhos da ordem de apenas alguns nanômetros, a quantidade de fótons de Raio X adquiridos, não permite obter uma relação sinal ruído suficiente para quantificar a composição química destes sistemas com precisão. Isto ocorre pois em sistemas nessa escala de tamanho, a quantidade de átomos nas partículas é reduzida e assim, a probabilidade de medir fótons de Raios X também é reduzida. Deste modo, dois fatores limitaram a caracterização composicional das nanopartículas. Primeiro, o ruído poissoniano relacionado a medida que devido a baixa contagens de fótons de Raios X, gerou uma barra de erro considerável. A incerteza varia com o tamanho da nanopartícula, sendo em média 12% com confiabilidade de 3σ em nanopartículas da amostra 1:3. Segundo, o limite de detecção da técnica de caracterização, que conforme explicamos na seção 3.2.2, é dado pela fração mínima de massa (MMF) que pode ser detectada (3.8). A MMF pode ser estimada pelas contagens de sinal característico e pelas contagens do sinal de fundo, que para uma nanopartícula de AgAu de 4.5 nm é por volta de 5%, com confiabilidade 3σ . Portanto, podemos dizer que a caracterização composicional das nanopartículas de AgAu dessa escala de tamanho, está no limite da técnica de detecção, o que limita a medida quantitativa realizada nas nanopartículas individualmente.

Além da estatística da medida, outro fator limitante no uso desta técnica é o fato da interação do feixe de elétrons com a amostra ser grande, assim átomos podem ser removidos

do material, devido ao efeito de *knock on*, durante a aquisição dos dados. Portanto, embora seja possível obter maiores contagens de fótons com maiores tempos de exposição ao feixe, também é maior o efeito do dano nas nanopartículas, ainda mais na condição de feixe convergente onde a dose é maior. As variações causadas pelo feixe, podem modificar sensivelmente a composição química da nanopartícula. Além disso, devido à instabilidades térmicas e mecânicas do instrumento de medida eventualmente o deslocamento do feixe com relação às nanopartículas prejudica a aquisição dos dados, gerando limitações no tempo de exposição por pixel e portanto tornando mais difícil atingir o limite de contagens necessário para quantificar a composição química. A limitação devido à dano nas amostras já vem sendo discutida pela comunidade e, conforme proposto por Jones(JONES et al., 2018), varreduras rápidas e feitas em maior quantidade ajudam a reduzir o dano sofrido às amostras, permitindo otimizar as aquisições de dados para obtenção de melhores resultados.

Devido a todas estas limitações, o uso de análise de componentes principais para redução de ruído se torna uma ferramenta de grande interesse para a quantificação da composição química das nossas amostras. Quando aplicado às imagens espectrais de nanopartículas de AgAu, PCA é capaz de melhorar significativamente a qualidade da imagem, como pode ser visto nos mapas elementais da figura 53. Com isso, ao utilizarmos PCA como filtro, obtivemos maior eficiência do processamento de dados do fluxograma na figura 42, onde é ilustrado o procedimento proposto neste projeto, que busca minimizar a intervenção humana no processamento dos dados, tornando toda a quantificação composicional das nanopartículas semi-automática e com poucos parâmetros de entrada. Com o uso do PCA conseguimos aumentar a probabilidade de identificar automaticamente as nanopartículas, conforme ilustrado pela figura 56. E também notamos a melhora nos ajustes de curvas para integração dos espectros de EDS das nanopartículas individuais.

Observamos neste trabalho, que ao quantificar as nanopartículas e exibir os dados na ordem temporal de coleta como exposto na figura 58, os dados tratados por PCA tiveram seus pontos pertencentes à um mesmo cubo de dados, convergindo para valores muito próximos. Aparentemente os valores medidos para a composição química das nanopartículas de AgAu convergiram para o valor da composição média das nanopartículas que compõe aquele cubo de dados. Isto nos indicou que a quantidade de contagens, mesmo com o uso do PCA, não é suficiente para diferenciar a composição destas nanopartículas, evidenciando que estamos em uma condição de contagens inferior ao do limite de quantificação proposto por (CURRIE, 1968), que a precisão necessária para distinguir uma composição química da outra, neste experimento, é insuficiente. Podendo as composições possuir valores mais próximos do que a incerteza permite diferenciar.

Como as nanopartículas são consideravelmente pequenas (3 nm - 9 nm) a obtenção de contagens de fótons de Raios X característico, com boa relação sinal-ruído e preservando a resolução espacial, se torna uma tarefa de difícil execução, pois a quantidade de sinal obtido

é proporcional à quantidade do material analisado. Assim, no processamento de dados por PCA, quando a matriz covariância é otimizada, a variância do sinal correspondente a variação de composição química, entre uma partícula e outra, é da mesma ordem de grandeza da variância correspondente ao ruído. Portanto, ao gerarmos as componentes principais, informação de significado físico inexistente devido ao ruído no conjunto de dados original seria necessária para a adequada reconstrução dos dados filtrados. Assim um *bias* estatístico é introduzido nos dados filtrados por PCA, sendo interpretado como um erro sistemático, um artefato na medida. Esse efeito já foi observado na literatura, como mostrado pelos trabalhos de Cueva (CUEVA et al., 2012), Lichtert (LICHTERT; VERBEECK, 2013) e Spiegelberg (SPIEGELBERG; RUSZ, 2017). Este resultado está de acordo com as simulações que realizamos, conforme mostrado pela figura 49, em que é possível observar que ao aumentar o número de contagens, o artefato gerado na quantificação composicional das nanopartículas deve desaparecer, pois nesta condição a informação se sobressai ao ruído, permitindo ao PCA separar o sinal do ruído.

A quantificação composicional de nanopartículas bimetálicas de tamanhos diminutos, como as que apresentamos neste trabalho, é portanto um sistema de difícil caracterização, que se encontra nos limites de quantificação da medida e nos limites experimentais do instrumento utilizado. Sendo assim, para melhor avaliar os efeitos do PCA na otimização da quantificação composicional de nanossistemas analisados por STEM-EDS, e reforçar o uso da metodologia de redução de ruído na caracterização química destes sistemas, propusemos um novo conjunto de dados. Em colaboração com o Prof. Dr. Ugarte, estudamos o mapa elemental de um nanofio de InGaP, que apresenta mais contagens por pixel do que os mapas elementais das nanopartículas de AgAu. Esse nanofio é um sistema mais robusto, com mais material para contribuir com o sinal de EDS. Além disso, o microscópio eletrônico utilizado para adquirir sua imagem espectral, possui maior capacidade de contagem de fótons de Raio X. Então, utilizamos este novo conjunto de dados para analisar o efeito do PCA na quantificação composicional e também para estimar uma barra de erro adequada para os resultados filtrados por PCA.

Assim como para o caso das nanopartículas, fizemos a quantificação composicional do nanofio comparando resultados sem o uso de PCA como filtro de ruído e com o uso de PCA. A quantificação foi realizada ao longo do fio, conforme ilustrado pelo esquemático da figura 65. Pela figura 67, podemos avaliar a dispersão dos pontos correspondentes aos valores das composições medidas, e verificamos que a dispersão é reduzida drasticamente no caso do uso de PCA. É também seguro dizer que, como não existe alteração do perfil da distribuição dos pontos, não existe a introdução de um *bias* na quantificação, como ocorre para as nanopartículas, indicando que o conjunto de dados possui uma quantidade suficiente de contagens para que o PCA possa funcionar sem induzir artefatos nos resultados.

No caso do nanofio também estimamos uma barra de erros e avaliamos a dispersão

dos pontos em uma região quimicamente homogênea do nanofio, conforme mostrado na figura 68. No conjunto de dados bruto, sem o processamento por PCA, a contagem média de fótons de In por ponto é 600 e o desvio padrão é 24, que coincide com o valor da ruído de Poisson. Já a contagem média de P é 391 fótons com 19 de desvio padrão, valor que também coincide com o ruído poissoniano. Após o uso de PCA, a média continua aproximadamente a mesma, enquanto o desvio padrão diminui um fator 1.7 para a distribuição de pontos do elemento In e 2.7 para a distribuição de pontos do elemento P. Propagando a redução dos desvios padrão das contagens para a quantificação composicional, subestimamos a barra de erros da composição química relativa de In/P em porcentagem de átomos, e assim determinamos a barra de erro para a quantificação pós redução de ruído, conforme apresentado na figura 69.

É importante também destacar que, com a redução do ruído da imagem espectral, pudemos verificar que o sistema é enriquecido em In ao longo do nanofio, partindo de sua base. De acordo com a figura 66, a composição de Ga diminui drasticamente ao longo do fio, tendendo a zero no final. Sabendo que Ga diminui ao longo do fio e verificando pela figura 67 que a composição química relativa de In/P aumenta, tem-se que a estequiometria é tal que ao longo do fio, os átomos de Ga são substituídos por átomos de In na fórmula estequiométrica da liga ternária InGaP.

A partir das simulações de imagens espectrais das nanopartículas e dos dados de nanofio InGaP com mais contagens, podemos dizer que com um número maior de contagens nas medidas por STEM-EDS, é possível medir adequadamente a composição química das nanopartículas de AgAu individualmente. Utilizando o PCA como critério para se definir o limite de contagens para a quantificação composicional, podemos estimar o número de contagens necessário para distinguir as pequenas variações entre uma partícula e outra. Realizamos portanto, o mesmo procedimento da seção 4.1, mas com uma diferença de 8% de átomos de Au na composição química das duas populações de partículas da imagem espectral simulada. Assim, encontramos que a contagem média obtida para a total separação das duas populações seria de 3500 contagens de fótons de Au $M\alpha$. Com isso, buscamos alternativas para alcançar maiores contagens para tentar quantificar as composições químicas das nanopartículas sem a indução de artefatos.

A alternativa que encontramos foi o uso de um microscópio modelo Titan-Themis do LNNano, que possui 4 detectores SDD espaçados angularmente, proporcionando um fator 4 no aumento das contagens e operando à 80 kV de energia de aceleração do feixe de elétrons. Estimando a razão das seções de choque ionizante para linhas de emissão da prata em 200 kV e 80 kV, é possível obter, ao reduzir a energia do feixe, um fator 2 nas contagens. Combinando a maior capacidade de detecção com a otimização da seção de choque de ionização, esperamos obter um fator 8 no aumento das contagens.

Nos resultados da seção 4.4, operando com um feixe de elétrons à 200 kV, obtivemos

uma contagem média de 300 fótons de Raios X na linha $M\alpha$ do Au. Já nos resultados da seção 4.7, utilizando o Titan à 80 kV e sob os mesmos parâmetros de aquisição, obtivemos 3300 de contagem média, ou seja, um fator 10 de aumento. Este valor está de acordo com o estimado, considerando os ganhos de contagem com detecção e redução de energia do feixe.

Ao aumentar as contagens, foi possível quantificar as nanopartículas de AgAu, sem observar o erro sistemático devido ao efeito de *bias* estatístico gerado pelo PCA. Estes resultados, em acordo com as simulações para uma variação de composição química da ordem de 8%, permitem verificar uma estreita dispersão das composições químicas individuais das nanopartículas. Nesta condição, a medida tem contagens suficientes para que a informação de pequenas variações de composição química sejam distinguíveis com relação ao ruído de Poisson. Este resultado, evidencia que o limite de quantificação para a medida das composições químicas individuais das nanopartículas de AgAu, é portanto ainda maior do que o critério proposto por Currie (CURRIE, 1968).

É importante notar, que ao reduzir a energia do feixe de elétrons, é esperado também uma diminuição do dano sofrido pelas nanopartículas, já que a seção de choque de *sputtering* diminui com a redução da energia (EGERTON et al., 2010). Assim, estimando as razões da seção de choque de *sputtering* para átomos de Ag, com feixes à 200 kV e 80 kV, é possível verificar um fator 2.5. Este fator, possibilita ainda, expor as nanopartículas ao feixe pelo menos duas vezes mais tempo, obtendo o dobro de contagens e o mesmo dano sofrido nos experimentos da seção 4.4.

Assim, com a otimização da aquisição dos dados proposta acima, pode ser possível o estudo local da composição química das nanopartículas ao diminuir a sonda da varredura, incrementando a resolução espacial. Isto nos permitiria obter, não somente o quanto de cada elemento está presente nas nanopartículas, mas também composição química em diferentes posições da estrutura, gerando informação quantitativa de sua morfologia. O que pode viabilizar, a verificação da segregação de átomos Ag na superfície de nanopartículas de tamanhos entre 3-10 nm, conforme proposto por Guisbiers (GUISBIERS et al., 2016).

Conclusões

Neste trabalho, propusemos a síntese e caracterização composicional de nanopartículas de AgAu. A síntese ocorreu pelo método de agregação em gás, utilizando um *magnetron sputtering* cilíndrico (SÁ et al., 2014). Para a caracterização composicional desenvolvemos uma metodologia, de quantificação da composição química de nanopartículas individuais, utilizando dados adquiridos por STEM-EDS. Fizemos essa metodologia, utilizando ferramentas de análise de imagens e de *machine learning* implementadas em python. Com essas ferramentas, tornamos o procedimento semi-automático com pouca ou nenhuma intervenção do usuário e também, estudamos o efeito de filtro de ruído por PCA em dados hiperspectrais.

Realizamos medidas STEM-EDS para a análise química com resolução espacial, permitindo a quantificação composicional das nanopartículas individualmente. Isso possibilitou verificar a dispersão estatística das composições ao redor de um valor médio bem definido. Esse resultado nos permite produzir amostras modelo de nanopartículas bimetalicas com tamanho e composição química controlados. No projeto, foram preparadas três amostras de nanopartículas de AgAu, de tamanhos entre 2.5 nm e 9 nm. Para a síntese dessas amostras utilizamos fios metálicos como alvo no *magnetron sputtering* e alterando o número de fios de cada elemento, modificamos a composição química média de cada amostra. À partir dos mapas elementais das três amostras, adquiridos por STEM-EDS e filtrados por PCA, a quantificação das composições médias, em porcentagem de átomos de Au, foram de $(76 \pm 3)\%$, $(54 \pm 4)\%$ e $(49 \pm 2)\%$.

O uso de PCA para redução de ruído dos dados hiperspectrais de STEM-EDS, mostrou-se efetivo e necessário para o desenvolvimento de um método semi-automático de caracterização composicional das nanopartículas. Principalmente devido a condição limite da técnica de caracterização, onde a baixa contagem de fótons de Raios X implica em dados ruidosos, que dificultam a identificação das nanopartículas e ajuste dos seus respectivos espectros.

As quantificações por STEM-EDS utilizando dados filtrados com PCA apresentam uma redução da dispersão ao redor do valor médio, o que implica em uma diminuição na incerteza da composição média para a distribuição dos pontos. No entanto, podemos observar, um artefato nas quantificações da composição química dos dados processados por PCA, que não existe nos dados brutos. As composições individuais de cada nanopartícula, pertencentes à um mesmo cubo de dados filtrado individualmente pelo PCA, possuem valores de composição química muito semelhantes. Isto ocorreu também em simulações que realizamos, para estudar o efeito do PCA nas imagens espectrais, de modo que o efeito

foi observado apenas na condição onde os dados são ruidosos, desaparecendo em dados processados sem ruído algum e também em dados com um número de contagens suficiente, da ordem de 700 contagens de Au para nanopartículas de 4.3 nm.

A introdução de um *bias* em imagens espectrais ruidosas filtradas por PCA já é prevista pela literatura como mostrado pelos trabalhos de Cueva (CUEVA et al., 2012), Lichtert (LICHTERT; VERBEECK, 2013) e Spiegelberg (SPIEGELBERG; RUSZ, 2017). Assim, o comportamento que observamos nos resultados experimentais e nos resultados simulados se deve a esse efeito de *bias* induzido, que surge pela negligência de informação física relevante nas componentes principais utilizadas para a reconstrução dos dados. No caso do presente trabalho, a informação física que desaparece no filtro por PCA é a variação de composição química entre uma nanopartícula e outra, pertencentes ao mesmo cubo de dados. É importante também acrescentar que devido as condições de detecção dos experimentos realizados, além do ruído poissoniano, a fração de massa mínima, que é definida estatisticamente através da relação entre o sinal e o ruído de fundo, também é outro fator limitante na caracterização das nanopartículas de AgAu. Assim, existe um limite na composição química que pode ser resolvida pela medida, restringindo a verificação de variabilidades entre as composições das nanopartículas que estejam abaixo desse valor de massa mínima detectável.

Estudando nanofios de ligas ternárias de InGaP, com melhor relação sinal-ruído e com informação química acima dos limites da técnica de caracterização, analisamos os efeitos de PCA em uma condição sem nenhum *bias* na quantificação da composição química. Nesse caso a redução do ruído devido ao uso de PCA ficou evidente. Assim, devido a ausência de artefatos, uma barra de erro no mínimo duas vezes menor pode ser estimada para os dados filtrados por PCA em relação aos dados brutos. Então, com os resultados apresentados tanto para as nanopartículas de AgAu quanto para o nanofio InGaP, podemos dizer que PCA promove maior qualidade no processamento de dados e reduz o ruído da imagem espectral, o que implica na redução da incerteza relacionada à quantificação. Porém, cuidados devem ser tomados ao utilizar este método de filtro, pois na ausência de informação suficiente para a reconstrução dos dados, erros sistemáticos podem ser atribuídos à análise.

Conforme mostrado neste trabalho, para melhorar os resultados obtidos para a quantificação das composições químicas das nanopartículas de AgAu, mesmo com o uso de filtro por PCA, precisamos melhorar a relação sinal-ruído, ou seja, aumentar o número de contagens. Podemos realizar isso, aumentando o tempo de exposição nas varreduras pela sonda de elétrons. Entretanto, ao aumentar o tempo das varreduras, a aquisição pode ser prejudicada tanto por possíveis danos às nanopartículas, quanto por erros de deslocamento do feixe. Para a continuidade deste trabalho, buscamos o uso de microscópios eletrônicos de transmissão com sistemas de detecção mais eficientes na coleção de fótons,

como instrumentos com mais espaço entre as peças polares da lente objetiva e detectores com maiores ângulos de coleção de fótons de Raio X.

Assim, realizamos novas medidas de STEM-EDS para quantificação da composição química no microscópio Cubed Titan-Themis do LNNano, que possui maior ângulo sólido de coleção de fótons que o JEM 2100F, devido ao uso de 4 detectores igualmente espaçados em 90°. Além disso, este modelo permite a redução da aceleração do feixe de elétrons para 80 kV, sem que ocorra perda de corrente da sonda de elétrons. Assim, pudemos obter um fator 10 no aumento das contagens, o que está de acordo com o estimado considerando o ganho pelos detectores e pela seção de choque ionizante aumentar um fator 2 para o feixe à 80 kV. Portanto, pudemos quantificar os dados processados por PCA sem a introdução de artefatos, confirmando que o efeito de bias estatístico desaparece ao se obter contagens suficientes para que a variância da correspondente às variações de composição entre uma partícula e outra, se sobressaia à variância do ruído de Poisson. Utilizando estes dados com mais contagens e comparando com as simulações realizadas, é possível estimar que a variação de composição química das nanopartículas é da ordem de 8%. Com isso, pudemos ultrapassar o limite de quantificação (CURRIE, 1968) necessário para distinguir a composição química das nanopartículas de AgAu.

Embora tenhamos mostrado que podemos quantificar as nanopartículas individualmente e que estas, seguem uma distribuição ao redor do valor médio da composição química da amostra, ainda são necessários mais medidas para melhor caracterizar a distribuição dos pontos e analisar a composição química em função do seu tamanho. Somado a isto, também temos como perspectiva, o uso de porta amostras criogênicos, pois ao resfriar as nanopartículas à temperaturas criogênicas, é possível que aumente a durabilidade das amostras durante a incidência do feixe de elétrons (EGERTON, 2012). Sendo que aumentar a durabilidade das nanopartículas, nos possibilita obter maiores contagens por aumentar o tempo de exposição nas varreduras pela sonda de elétrons. Outro método que podemos utilizar para a redução de dano para explorar mais contagens é o uso de varreduras rápidas na aquisição dos dados, adquirindo centenas de *frames* em um curto tempo de exposição ao feixe de elétrons (JONES et al., 2018) e com posterior soma dos *frames* realizando correção numericamente do deslocamento do feixe.

Neste trabalho pude aprender o preparo de amostras de nanopartículas bimetálicas com composição química e tamanho controlados pelo método de agregação em gás. Também aprendi a utilizar um microscópio eletrônica de transmissão para caracterizar materiais, onde obtive experiência com o básico do modo imagem TEM e STEM e aprofundi o conhecimento no modo espectroscopia EDS, com ênfase na quantificação pelo método Cliff-Lorimer. Aprendi também, a programar em python e a processar dados utilizando ferramentas de processamento de imagens e *machine learning*, implementados nesta linguagem. Com isso, desenvolvi uma metodologia de quantificação composicional semi-

automática de nanopartículas bimetálicas, utilizando PCA como filtro de ruído. Assim, pude investigar as limitações do método com dados experimentais e simulados, propondo possíveis soluções.

Referências

- ALLEN, L. J. et al. Elemental mapping in scanning transmission electron microscopy. In: *Journal of Physics: Conference Series*. [S.l.: s.n.], 2010. v. 241, n. 1. ISBN 1742-6596. ISSN 17426596. Citado na página 32.
- AMENDOLA, V. et al. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: A review. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 29, n. 20, p. 203002, 2017. ISSN 1361648X. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 27.
- ANGELINI, I. et al. Chemical analyses of Bronze Age glasses from Frattesina di Rovigo, Northern Italy. *Journal of Archaeological Science*, v. 31, n. 8, 2004. ISSN 03054403. Citado na página 25.
- ASLAM, U.; CHAVEZ, S.; LINIC, S. Controlling energy flow in multimetallic nanostructures for plasmonic catalysis. *Nature Nanotechnology*, v. 12, p. 1000–1005, 2017. ISSN 17483395. Citado na página 22.
- BELIANINOV, A. et al. Erratum: Big data and deep data in scanning and electron microscopies: deriving functionality from multidimensional data sets. *Advanced Structural and Chemical Imaging*, 2015. ISSN 2198-0926. Citado na página 32.
- BENTEN, W. et al. Photon emission spectroscopy of single oxide-supported Ag-Au alloy clusters. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, v. 72, n. 4, 2005. ISSN 10980121. Citado 3 vezes nas páginas 13, 35 e 36.
- BRAIDY, N. et al. Quantitative energy dispersive X-ray microanalysis of electron beam-sensitive alloyed nanoparticles. *Microscopy and Microanalysis*, v. 14, n. 2, p. 166–75, 2008. ISSN 14319276. Citado 4 vezes nas páginas 15, 62, 63 e 79.
- BRAUNGER, M. L. et al. Microfluidic electronic tongue applied to soil analysis. *Chemosensors*, v. 5, n. 2, 2017. Citado na página 64.
- BUCHWALTER, P.; ROSÉ, J.; BRAUNSTEIN, P. Multimetallic catalysis based on heterometallic complexes and clusters. *Chemical Reviews*, v. 115, n. 1, p. 28–126, 2015. ISSN 15206890. Citado na página 22.
- BUFFAT, P.; BOREL, J. P. Size effect on the melting temperature of gold particles. *Physical Review A*, v. 13, 1976. ISSN 10502947. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 26.
- BURDET, P.; CROXALL, S. A.; MIDGLEY, P. A. Enhanced quantification for 3D SEM-EDS: Using the full set of available X-ray lines. *Ultramicroscopy*, v. 148, p. 158–167, 2015. ISSN 18792723. Citado na página 59.
- CAPRIHAN, A.; PEARLSON, G. D.; CALHOUN, V. D. Application of principal component analysis to distinguish patients with schizophrenia from healthy controls based on fractional anisotropy measurements. *NeuroImage*, v. 42, p. 675–682, 2008. ISSN 10538119. Citado na página 64.

CASTRO, T. et al. Size-dependent melting temperature of individual nanometer-sized metallic clusters. *Physical Review B*, v. 42, n. 13, p. 8548–8556, 1990. ISSN 01631829. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 26.

CHEN, P.-C. et al. Polyelemental nanoparticle libraries. *Science (New York, N.Y.)*, v. 352, n. 6293, p. 1565–9, 2016. ISSN 1095-9203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27339985>>. Citado 8 vezes nas páginas 12, 15, 22, 23, 30, 31, 45 e 58.

CLIFF, G.; LORIMER, G. W. The quantitative analysis of thin specimens. *Journal of Microscopy*, v. 103, n. 2, p. 203–207, 1975. ISSN 13652818. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 77.

CORTIE, M. B.; MCDONAGH, A. M. Synthesis and optical properties of hybrid and alloy plasmonic nanoparticles. *Chemical Reviews*, v. 111, n. 6, p. 3713–3735, 2011. ISSN 00092665. Citado na página 22.

CUEVA, P. et al. Data processing for atomic resolution electron energy loss spectroscopy. In: *Microscopy and Microanalysis*. [S.l.: s.n.], 2012. v. 18, n. 4, p. 667–675. ISBN 1431-9276. ISSN 14319276. Citado 4 vezes nas páginas 70, 77, 105 e 109.

CURRIE, L. A. Limits for Qualitative Detection and Quantitative Determination: Application to Radiochemistry. *Analytical Chemistry*, 1968. ISSN 15206882. Citado 5 vezes nas páginas 56, 57, 104, 107 e 110.

De La Peña, F. et al. Electron Microscopy (Big and Small) Data Analysis With the Open Source Software Package HyperSpy. *Microscopy and Microanalysis*, v. 23, n. S1, p. 214–215, 2017. ISSN 1431-9276. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 73.

DUPUIS, V. et al. Intrinsic magnetic properties of bimetallic nanoparticles elaborated by cluster beam deposition. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 17, 2015. ISSN 14639076. Citado na página 22.

EGERTON, R. F. Mechanisms of radiation damage in beam-sensitive specimens, for TEM accelerating voltages between 10 and 300 kV. *Microscopy Research and Technique*, v. 75, n. 11, p. 1550–1556, 2012. ISSN 1059910X. Citado na página 110.

EGERTON, R. F.; LI, P.; MALAC, M. Radiation damage in the TEM and SEM. In: *Micron*. [S.l.: s.n.], 2004. v. 35, n. 6, p. 399–409. ISBN 0968-4328. ISSN 09684328. Citado 2 vezes nas páginas 61 e 62.

EGERTON, R. F. et al. Basic questions related to electron-induced sputtering in the TEM. *Ultramicroscopy*, v. 110, p. 991–997, 2010. ISSN 03043991. Citado 2 vezes nas páginas 62 e 107.

FERRANDO, R.; JELLINEK, J.; JOHNSTON, R. L. *Nanoalloys: From theory to applications of alloy clusters and nanoparticles*. 2008. 845–910 p. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 29.

F.R.S., K. P. Liii. on lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, Taylor Francis, v. 2, n. 11, p. 559–572, 1901. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/14786440109462720>>. Citado na página 64.

- GARCÍA, S. et al. Microwave synthesis of classically immiscible rhodium-silver and rhodium-gold alloy nanoparticles: Highly active hydrogenation catalysts. *ACS Nano*, v. 8, n. 11, p. 1512. ISSN 1936086X. Citado 3 vezes nas páginas 12, 22 e 29.
- GAUDRY, M. et al. Size and composition dependence in the optical properties of mixed (transition metal/noble metal) embedded clusters. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, v. 67, 2003. ISSN 1550235X. Citado na página 25.
- GUISBIERS, G. et al. Electrum, the gold-silver alloy, from the bulk scale to the nanoscale: Synthesis, properties, and segregation rules. *ACS Nano*, v. 10, n. 1, p. 188–198, 2016. ISSN 1936086X. Citado 5 vezes nas páginas 13, 22, 35, 37 e 107.
- HABERLAND, H. et al. Filling of micron-sized contact holes with copper by energetic cluster impact. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, v. 12, n. 5, p. 2925–2930, 1994. ISSN 0734-2101. Disponível em: <<http://avs.scitation.org/doi/10.1116/1.578967>>. Citado na página 38.
- HEDAYATNASAB, Z.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Materials and Design*, v. 123, p. 174–196, 2017. ISSN 18734197. Citado na página 25.
- HILLENKAMP, M.; DOMENICANTONIO, G. D.; FELIX, C. Monodispersed metal clusters in solid matrices: A new experimental setup. *Review of Scientific Instruments*, v. 77, n. 2, 2006. ISSN 00346748. Citado na página 38.
- HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Warwick & York, US*, v. 24, n. 6, p. 417–441, 1933. Citado na página 64.
- HÜHN, J. et al. Selected Standard Protocols for the Synthesis, Phase Transfer, and Characterization of Inorganic Colloidal Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, v. 29, n. 1, p. 399–461, 2017. ISSN 0897-4756. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 25.
- HUTTEL, Y. *Gas-Phase Synthesis of Nanoparticles*. 1. ed. [S.l.]: Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 2017. v. 1. ISBN 9783527698417. Citado 4 vezes nas páginas 13, 38, 39 e 40.
- JANY, B. R.; JANAS, A.; KROK, F. Retrieving the Quantitative Chemical Information at Nanoscale from Scanning Electron Microscope Energy Dispersive X-ray Measurements by Machine Learning. *Nano Letters*, v. 17, n. 11, p. 6520–6525, 2017. ISSN 15306992. Citado na página 66.
- JONES, L. et al. Managing dose-, damage- and data-rates in multi-frame spectrum-imaging. *Microscopy*, v. 67, n. 1, p. 98–113, 2018. ISSN 20505701. Citado 3 vezes nas páginas 63, 104 e 110.
- KEENAN, M. R.; KOTULA, P. G. Accounting for Poisson noise in the multivariate analysis of ToF-SIMS spectrum images. *Surface and Interface Analysis*, v. 36, p. 203–212, 2004. ISSN 01422421. Citado na página 67.
- KOTULA, P. G.; KEENAN, M. R.; MICHAEL, J. R. Automated analysis of SEM X-ray spectral images: A powerful new microanalysis tool. *Microscopy and Microanalysis*, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2003. ISSN 14319276. Citado 6 vezes nas páginas 15, 23, 33, 57, 66 e 68.

- KOUSAL, J. et al. Magnetron-sputtered copper nanoparticles: lost in gas aggregation and found by in situ X-ray scattering. *Nanoscale*, 2018. ISSN 20403372. Citado na página 102.
- LAEGREID, N.; WEHNER, G. K. Sputtering yields of metals for Ar^+ and Ne^+ ions with energies from 50 to 600 eV. *Journal of Applied Physics*, v. 32, n. 365, 1961. ISSN 00218979. Citado na página 43.
- LASSERUS, M. et al. Thermally induced alloying processes in a bimetallic system at the nanoscale: AgAu sub-5 nm core-shell particles studied at atomic resolution. *Nanoscale*, v. 10, n. 4, 2018. ISSN 20403372. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 36.
- LI, Z. Y. et al. Structures and optical properties of 4-5 nm bimetallic AgAu nanoparticles. *Faraday Discussions*, v. 138, p. 363–373, 2008. ISSN 13645498. Citado na página 36.
- LICHTERT, S.; VERBEECK, J. Statistical consequences of applying a PCA noise filter on EELS spectrum images. *Ultramicroscopy*, v. 125, p. 35–42, 2013. ISSN 03043991. Citado 4 vezes nas páginas 70, 77, 105 e 109.
- LIU, G. et al. Using Scanning-Probe Block Copolymer Lithography and Electron Microscopy to Track Shape Evolution in Multimetallic Nanoclusters. *ACS Nano*, v. 9, n. 12, p. 12137–12145, 2015. ISSN 1936086X. Citado na página 23.
- LORIMER, G. W. Quantitative X-ray Microanalysis of Thin Specimens in the Transmission Electron Microscope; A Review. *Mineralogical Magazine*, v. 51, n. 359, p. 49–60, 1987. ISSN 0026-461X. Citado 2 vezes nas páginas 45 e 60.
- LU, H. M. et al. Size-dependent ordering and Curie temperatures of FePt nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, v. 103, n. 12, 2008. ISSN 00218979. Citado na página 22.
- MAKSYMOW, I. S. Magneto-plasmonic nanoantennas: Basics and applications. *Reviews in Physics*, v. 1, p. 36–51. ISSN 24054283. Citado na página 22.
- MERCANTE, L. A. et al. Electronic tongue based on nanostructured hybrid films of gold nanoparticles and phthalocyanines for milk analysis. *Journal of Nanomaterials*, 2015. ISSN 16874129. Citado na página 25.
- NEWBURY, D. E. X-ray spectrometry and spectrum image mapping at output count rates above 100 kHz with a silicon drift detector on a scanning electron microscope. *Scanning*, v. 27, n. 5, p. 227–239, 2005. ISSN 0161-0457. Citado na página 32.
- PARISH, C. M.; BREWER, L. N. Multivariate statistics applications in phase analysis of STEM-EDS spectrum images. *Ultramicroscopy*, v. 110, n. 2, p. 134–143, 2010. ISSN 0304-3991. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304399109002381>>. Citado 4 vezes nas páginas 23, 33, 64 e 66.
- PEIRIS, S.; MCMURTRIE, J.; ZHU, H. Y. Metal nanoparticle photocatalysts: Emerging processes for green organic synthesis. *Catalysis Science and Technology*, 2016. ISSN 20444761. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 27.
- Piriya V.S., A. et al. Colorimetric sensors for rapid detection of various analytes. *Materials Science and Engineering: C*, v. 78, p. 1231–1245, 2017. ISSN 0928-4931. Citado na página 25.

- ROSSOUW, D. et al. *Multicomponent Signal Unmixing from Nanoheterostructures: Overcoming the Traditional Challenges of Nanoscale X-ray Analysis via Machine Learning*. 2015. 2716-2720 p. Citado 7 vezes nas páginas 13, 23, 33, 34, 35, 59 e 66.
- SÁ, A. D. T. de et al. New experimental setup for metallic clusters production based on hollow cylindrical magnetron sputtering. *Journal of Vacuum Science & Technology B, Nanotechnology and Microelectronics: Materials, Processing, Measurement, and Phenomena*, v. 32, n. 6, p. 061804, 2014. ISSN 2166-2746. Disponível em: <<http://avs.scitation.org/doi/10.1116/1.4900847>>. Citado 5 vezes nas páginas 22, 38, 43, 102 e 108.
- SCAIANO, J. C.; STAMPLECOSKIE, K. G.; HALLETT-TAPLEY, G. L. Photochemical Norrish type I reaction as a tool for metal nanoparticle synthesis: Importance of proton coupled electron transfer. *Chemical Communications*, v. 40, n. 48, p. 4798–4808, 2012. ISSN 13597345. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 28.
- SHI, H. et al. Au@Ag/Au nanoparticles assembled with activatable aptamer probes as smart "nano-doctors" for image-guided cancer thermotherapy. *Nanoscale*, v. 6, n. 15, p. 8754–8761, 2014. ISSN 20403372. Citado na página 35.
- SHIBATA, T. et al. Size-dependent spontaneous alloying of Au-Ag nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 40, p. 11989–11996, 2002. ISSN 00027863. Citado na página 36.
- SHLENS, J. A tutorial on principal component analysis derivation, discussion and singular value decomposition. In: . [S.l.: s.n.], 2003. Citado na página 65.
- SPIEGELBERG, J.; RUSZ, J. Can we use PCA to detect small signals in noisy data? *Ultramicroscopy*, v. 172, p. 40–46, 2017. ISSN 18792723. Citado 6 vezes nas páginas 16, 71, 72, 77, 105 e 109.
- SWIHART, M. T. Vapor-phase synthesis of nanoparticles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 8, p. 127–133, 2003. ISSN 13590294. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 25.
- TAVARES, A. D. *Nano-agregados metálicos: Produção e propriedades magnéticas*. Tese (Doutorado), 2013. Citado 6 vezes nas páginas 13, 14, 41, 42, 43 e 44.
- TIZEI, L. H. G. *Análise Quantitativa de Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão de Resolução Atômica : Aplicação ao Estudo da Rugosidade e Interdifusão em Interfaces de Poços Quânticos de InGaP / GaAs*. Tese (Doutorado), 2008. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 45.
- WALT, S. van der et al. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ*, v. 2, p. e453, 6 2014. ISSN 2167-8359. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.453>>. Citado na página 83.
- WANG, A. Q.; CHANG, C. M.; MOU, C. Y. Evolution of catalytic activity of Au-Ag bimetallic nanoparticles on mesoporous support for CO oxidation. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 109, n. 40, p. 18860–18867, 2005. ISSN 15206106. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 35.

WATANABE, M. et al. Improvements in the X-ray analytical capabilities of a scanning transmission electron microscope by spherical-aberration correction. In: *Microscopy and Microanalysis*. [S.l.: s.n.], 2006. v. 12, n. 6, p. 515–526. ISBN 1431-9276\1435-8115. ISSN 14319276. Citado na página 33.

WILCOXON, J. P.; ABRAMS, B. L. *Synthesis, structure and properties of metal nanoclusters*. 2006. 1162-1194 p. Citado na página 36.

WILLIAMS, B. D. et al. *Transmission Electron Microscopy: a textbook for Materials Science*. [s.n.], 2009. V1-V4. 760 p. ISSN 19406029. ISBN 9780387765006. Disponível em: <<http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0820/96028435-d.html>>. Citado 4 vezes nas páginas 15, 31, 54 e 55.

XU, Z.; HOU, Y.; SUN, S. Magnetic core/shell Fe₃O₄/Au and Fe₃O₄/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties. *Journal of the American Chemical Society*, v. 129, n. 28, p. 8698–8699, 2007. ISSN 00027863. Citado na página 22.

YANKOVICH, A. B. et al. Non-rigid registration and non-local principle component analysis to improve electron microscopy spectrum images. *Nanotechnology*, v. 27, n. 36, 2016. ISSN 13616528. Citado na página 59.

ZHANG, L. et al. Two-stage image denoising by principal component analysis with local pixel grouping. *Pattern Recognition*, v. 43, n. 4, p. 1531–1549, 2010. ISSN 00313203. Citado na página 64.